

Università degli studi della Tuscia

Facoltà di Agraria

Dipartimento di Protezione delle Piante-Sezione di Patologia Vegetale-Agr 12

A.A. 2007-2008

**Dottorato di Ricerca in Protezione delle Piante
XVIII – ciclo**

Coordinatore del Dottorato

Prof. Leonardo Varvaro

Dottoranda

Dott.ssa Barbara Pasquini

Tutore

Prof. Andrea Vannini

Tesi di Dottorato

“Indagini epidemiologiche, fenotipiche e genotipiche di
popolazioni del fungo *Cryphonectria parasitica* nel
Comprensorio dei Monti Cimini “

Indice

1. Introduzione	pag. 2
1.1 Inquadramento sistematico del fungo	pag. 2
1.2 Il fungo <i>Cryphonectria parasitica</i>	pag. 4
1.2.1 Biologia	pag. 7
1.2.2 L'ipovirulenza esclusiva	pag. 9
1.3 L'incompatibilità vegetativa	pag. 13
1.4 Strategie riproduttive	pag. 16
1.5 <i>Cryphonectria parasitica</i> nelle popolazioni italiane	pag. 20
1.5.1 Attuale situazione delle popolazioni di <i>Cryphonectria parasitica</i> nel comprensorio dei Monti Cimini	pag. 22
2. Scopo della tesi	pag. 23
3. Materiali e metodi	pag. 27
3.1 Aree di studio	pag. 27
3.2 Attività di campionamento	pag. 27
3.3 Attività di laboratorio	pag. 29
3.4 Isolamento e osservazione dei periteci	pag. 30
3.4.1 Capacità di espulsione delle spore	pag. 31
3.4.2 Osservazione del grado di maturità della parete dei periteci	pag. 31
3.4.3 Conta delle spore	pag. 32
3.4.4 Conta delle Unità Formanti Colonie	pag. 33
3.4.5 Morfologia delle colonie	pag. 34
3.4.6 Test della compatibilità tra la progenie	pag. 35

3.5 Determinazione dei tipi sessuali	pag. 36
3.6 Studio della progenie con heterocaryon	pag. 42
3.7 Elaborazione statistica	pag. 42
4. Risultati	pag. 43
4.1 Aree di studio	pag. 43
4.2 Attività di campionamento	pag. 46
4.3 Osservazione diretta dei periteci	pag. 53
4.4 Conta delle cellule in vitro ed in vivo	pag. 57
4.5 Test di compatibilità	pag. 62
4.6 Analisi dei tipi sessuali (MAT)	pag. 66
5. Discussioni	pag. 70
6. Conclusioni	pag. 73
7. Bibliografia	pag. 75
Ringraziamenti	pag. 81

1. Introduzione

1.1- Inquadramento sistematico del fungo *Cryphonectria parasitica*

Cryphonectria parasitica (Murr) Barr (sin *Endothia parasitica* Murr. And) è il fungo Ascomycota agente eziologico del cancro corticale del castagno (*Castanea* spp). Questo fungo è stato segnalato anche sui generi *Quercus* (Turchetti e Maresi, 1990) ed *Eucalyptus* spp. (Old e Kobayashi, 1988), sebbene tali ospiti sono di norma colonizzati da specie appartenenti allo stesso genere o generi affini come *C. cubensis* (Brun.), *C. havenensis* (Brun.) Barr ed *Endothia gyrosa* (Schw. Ex Fries).

Dal punto di vista sistematico, la specie *Cryphonectria parasitica* appartiene al phyla *Ascomycota*, ordine *Diaporthales*, genere *Cryphonectria*. Gli Ascomiceti sono il gruppo più numeroso di specie viventi, circa 15.000. La loro fase vegetativa prevede un micelio settato, con fase cellulare aploide. La fase finale dell'attività vegetativa prevede la riproduzione sessuata del fungo, previa meiosi dei nuclei diploidi seguita dalla formazione di organi di propagazione aploide; le ascospore possono essere uni e pluricellulari, inserite in particolari strutture a forma di sacchi, gli aschi. La germinazione delle ascospore dà corso ad un nuovo inizio della fase vegetativa. Gli ascomiceti vengono classificati in base al tipo del corpo di fruttificazione che producono; si tende a suddividerli in tre

sottoclassi, ciascuna definita da una particolare struttura nella quale gli aschi vengono prodotti: Hemiascomycetidae, Euascomycetidae e Loculoascomycetidae. *Cryphonectria parasitica*, *Neurospora*, *Sordaria*, *Gibberella* (*Fusarium*), *Emicerella* (*Aspergillus*), *Claviceps* e *Sclerotinia* sono inseriti nella sottoclasse degli Euascomycetidae, i quali formano gli aschi immersi nelle strutture miceliari, che si differenziano come parti del ciclo sessuale in : cleistotecii, peritecii e apotecii. Gli aschi sono spesso generati in un distinto strato a palizzata, l'imenio, all'interno o sul tessuto dell'asco (Figura 1).

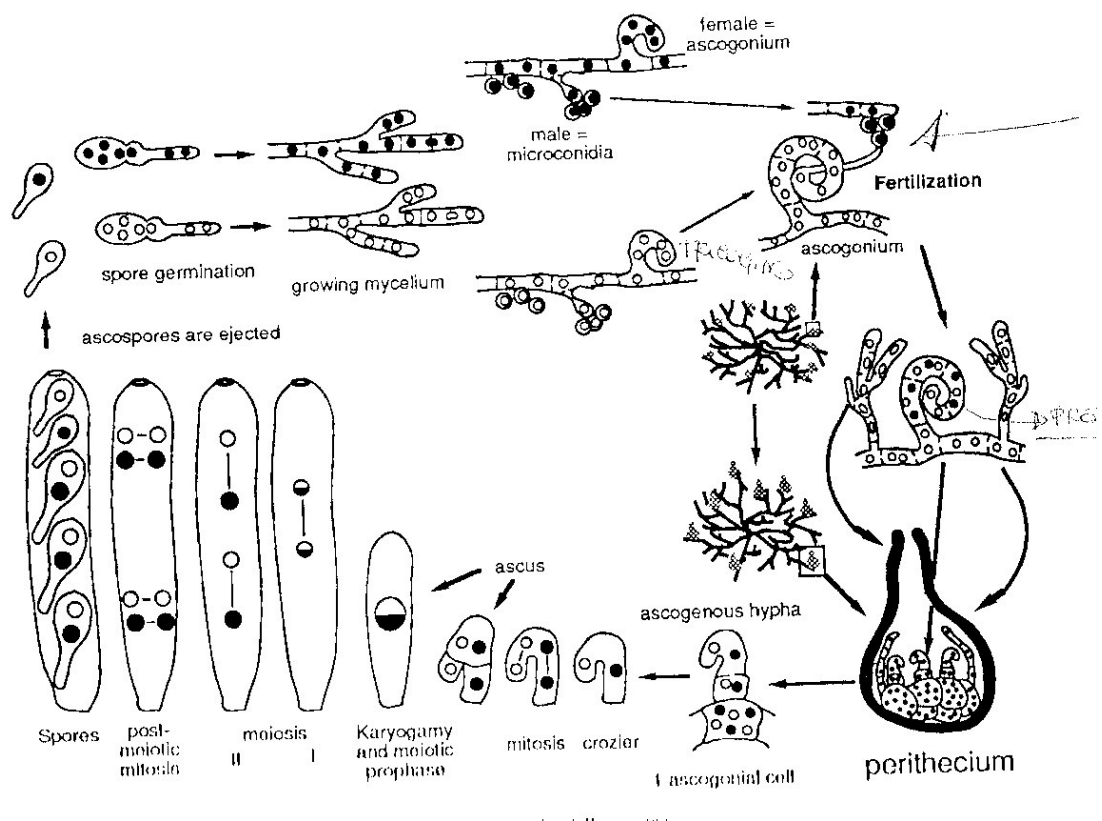


Figura 1- Ciclo sessuale di *Cryphonectria parasitica*.

1.2- Il fungo *Cryphonectria parasitica*

Il cancro corticale del castagno (*Castanea* spp.) è causato da *Cryphonectria parasitica*, ed è considerato una delle malattie necrotiche più dannose dei castagneti. Le specie del genere *Castanea* sono suscettibili all'infezione. Molto colpite dal cancro sono le specie americane, *C. dentata* e *C. pumila*; quella europea, *C. sativa*, ha una minore suscettibilità; abbastanza resistente quella giapponese, *C. crenata*; più resistente quella cinese, *C. mollissima*.

Il fungo è stato segnalato nel 1904 in Nord America dove ha provocato in poco tempo la distruzione della popolazione naturale di *C. dentata* Marsh. L'introduzione della malattia nel continente americano si è avuta probabilmente tramite l'importazione di materiale vivaistico infetto dall'est Asiatico dove *C. parasitica* è presente, in Giappone, su *C. crenata* (Sieb et Zucch.) e, in Cina, su *C. mollissima* (Blum). Recenti studi sulla struttura delle popolazioni del fungo *C. parasitica* hanno dimostrato mediante l'analisi del polimorfismo della lunghezza dei frammenti di restrizione (RFLP) che l'introduzione del patogeno in Nord America è avvenuta molto probabilmente dal Giappone (Milgroom *et al* 1996). Non altrettanto sicuri si è per l'origine dell'introduzione in Europa. Tuttavia, Heiniger e Rigling (1994) suggeriscono che *C. parasitica* sia stato introdotto dal Nord America attraverso materiale vegetale ibrido di castagno proveniente dall'Asia, data la particolare resistenza al mal

dell'inchiostro, causata da *Phytophthora cinnamomi*..

Il cancro corticale si è diffuso rapidamente negli Stati Uniti nell'intero areale della *C. dentata* provocando la morte di oltre un miliardo di piante (Anagnostakis and Kranz, 1987) e limitando la presenza della specie ad alcuni polloni ricacciati da ceppaie di alberi morti (Roane *et al.*, 1986) e a poche isole di vegetazione localizzate nelle catene montuose del West.

La diffusione in Europa è stata facilitata da materiale introdotto nei punti d'approdo delle navi di provenienza transoceanica. La prima segnalazione in Italia risale al 1938 in Liguria su castagno europeo (*Castanea sativa* Mill). La malattia si è diffusa in poco tempo con decorso epidemico in tutta Europa, sebbene con velocità inferiore rispetto al nord America ed è oggi presente nella totalità delle aree castanicole italiane e in numerosi paesi europei. I motivi che hanno impedito il verificarsi in Italia e in Europa di un epidemia come quella nord americana (Berry, 1960; Hebard, 1982) sono dovuti essenzialmente ad una maggiore resistenza di *C. sativa* rispetto a *C. dentata* e alla maggiore facilità di diffusione dell'ipovirulenza esclusiva in Europa, che ha favorito il controllo naturale della malattia (vedi paragrafo 1.3.2)

Il fungo colpisce i fusti di piante giovani e adulte, i rami e i ricci. Le piante attaccate si riconoscono a distanza per la presenza di disseccamenti dei rami e di branche sulle quali molto spesso rimangono attaccate le foglie e i ricci. La penetrazione avviene tramite soluzioni di continuità, in

particolare attraverso le microferite naturali localizzate all'ascella dei rami, ma anche attraverso ferite da animali, cretti da gelo o lesioni causate dall'azione antropica. Il fungo si diffonde nelle zone sottostanti in senso trasversale, provocando un investimento circolare della corteccia con la presenza di ammassi miceliari cremeo giallastri. Questi ultimi hanno una tipica disposizione a palmetta e sono identificativi per la specie rispetto ad altri parassiti del genere *Endothia* ad abito saprofitario che si possono trovare sul castagno come *Endothia girosa*, *Endothia fluens*, etc. Gli organi legnosi dell'ospite sono caratterizzati dalla presenza di aree color rosso mattone che tendono ad allargarsi in direzione longitudinale e tangenziale. Man mano che la malattia progredisce, l'area necrotica assume un aspetto depresso e il micelio colonizza i tessuti più profondi fino a provocare la morte dei meristemi cambiali bloccando la produzione di nuovi tessuti. È tale la velocità di diffusione del parassita nell'ospite che raramente la pianta riesce a reagire con formazioni cicatriziali. In conseguenza di ciò si crea una tensione meccanica dovuta ad un accrescimento della parte sana del legno che determina uno stiramento delle zone necrosate. Questo processo termina con la presenza di fessure longitudinali molto profonde denominate "cancri", che interessano i tessuti corticali fino al legno. La rigidità del legno dovuta alla morte dei tessuti invasivi, crea delle spaccature che si approfondiscono sempre più lasciando il legno allo scoperto. Le lesioni, dovute al cancro tendono ad

allargarsi fino a circondare completamente l'organo colpito, determinando un blocco del trasporto linfatico, e quindi il disseccamento della porzione distale dell'organo stesso. Al di sotto del cancro si ha un risveglio di gemme latenti con caratteristica emissione di rami epicormici.

I cancri che portano a morte l'organo colpito sono detti letali. Esistono anche dei cancri non letali, che interessano solamente gli strati corticali più esterni lasciando quelli più interni indenni. In tal caso i tessuti cambiali non vengono mai interessati dalla necrosi, e la pianta riesce velocemente a cicatrizzare le lesioni mediante la formazioni di un callo, manifestando un notevole recupero vegetazionale; vedremo in seguito che tali cancri sono causati da ceppi ipovirulenti del fungo (paragrafo 1.3.2).

1.2.1- Biologia

Le attuali conoscenze sulla biologia e l'epidemiologia dello stadio sessuale di *Cryphonectria parasitica* sono basate essenzialmente su studi Americani condotti agli inizi del secolo scorso. In Europa il verificarsi della produzione dei periteci e pertanto il compimento dell'intero ciclo vitale del fungo, sembrano essere accertati in numerosi paesi, ma apparentemente con una bassa frequenza dell'avvenimento (Heiniger and Rigling, 1994). Recentemente lo stadio sessuale è stato rinvenuto in 9 su 10 popolazioni Italiane studiate su 10, segnalando così la potenzialità per la riproduzione sessuale (Milgroom & Cortesi, 1999). In Francia il 49%

dei campioni di cancro raccolti con stroma il 20% presentano periteci (Guerin *et al.*, 1999); un simile rapporto tra stroma raccolto e quantità di periteci presenti è stato osservato anche in Svizzera (Prospero *et al.*, 1998) (Guerin *et al.*, 2001).

Generalmente gli organi di riproduzione agamica e gamica del fungo si riscontrano fra le fessurazioni dei cancri, picnidi e periteci. I picnidi, di colore rosso ruggine, si formano in primavera e in autunno all'interno di strutture stromatiche sui tessuti colpiti. Quando i picnidi giungono a maturità liberano attraverso l'ostiole i conidi, spore asessuali unicellulari di forma cilindrica, inglobati in un materiale vischioso che fuoriesce a forma di cirro spiralato. Il trasporto dei conidi è per lo più legato all'acqua che, sciogliendo la sostanza vischiosa contenente i conidi, li libera e li trasporta; anche gli insetti, il vento, gli uccelli, possono contribuire alla disseminazione; tuttavia questo tipo di disseminazione copre brevi distanze.

I periteci hanno la forma di fiaschetto completamente immerso nello stroma con collo lungo, ad andamento sinuoso, terminante con una apertura ostiolare che emerge sempre dai tessuti stromatici. A maturità si estroflette all'esterno. All'interno i periteci presentano numerosi aschi allungati con otto ascospore bicellulari che, giunte a maturità, vengono liberate mediante un fenomeno meccanico di espulsione, e trasportate dal vento a grandi distanze (Roane *et al.*, *loc cit*). La vitalità delle ascospore, può essere

molto elevata, anche fino a due anni. I periteci si rinvennero in autunno, raramente in Europa e più frequentemente in Nord America (Griffin, 1986).

1.2.2- L'ipovirulenza esclusiva

Negli anni 50' uno studioso italiano, Biraghi osservò dei cancri che tendevano a cicatrizzare, e non manifestavano un decorso letale per l'organo colpito. Successivamente, due studiosi francesi, Grente e Sauret (1969) riuscirono ad isolare da cancri cicatrizzati di piante sopravvissute alla malattia, alcuni ceppi di *C. parasitica*. Tali ceppi mostravano in coltura delle anomalie morfologiche rispetto a quelle che causavano cancri letali. Essi infatti mostravano, scarsa pigmentazione del micelio, ridotta capacità sporulativa, e ridotta virulenza quando inoculati su piante di castagno sane. I ceppi che presentavano queste caratteristiche furono denominati ipovirulenti per distinguerli da quelli a fenotipo normale. In seguito gli stessi studiosi dimostrarono che attraverso il processo dell'anastomosi ifale (fusione delle ife del micelio), le caratteristiche dei ceppi ipovirulenti potevano essere trasmesse ai ceppi normali con lo scambio di materiale citoplasmatico.

Infatti, inoculando artificialmente attorno ad un cancro letale il ceppo ipovirulento, i sintomi della malattia regredivano lentamente, con una buona risposta della pianta. Parallelamente inoculando un ceppo ipovirulento su una pianta sana, il cancro che ne risultava era superficiale

e non letale. La capacità del fenotipo ipovirulento di far regredire i sintomi e creare una progressiva cicatrizzazione delle lesioni, una volta inoculato ai margini di un cancro, viene chiamata “ipovirulenza esclusiva” (Grente e Sauret, *loc.cit.*). In seguito ad esperienze condotte su un alto numero di ceppi ipovirulenti in diversi laboratori mondiali, è stato evidenziato come essi mostrino una vasta gamma di forme fenotipiche, anche riguardo la patogenicità, che va dal mancato sviluppo sui tessuti dell’ospite, fino ad una virulenza simile a quella dei ceppi a fenotipo normale. (Mac Donald e Fullbright 1991).

La trasmissione naturale dell’ipovirulenza, nella popolazione del patogeno è stata associata all’attenuazione della fase epidemica del cancro del castagno, osservato in molte aree europee dopo il 1951 (Heiniger e Rigling *loc. cit.*).

L’ipovirulenza in *C. parasitica* è causata dall’iperparassitismo di un micovirus del genere *Hypovirus* , caratterizzato dall’assenza di capsidi proteici e il cui ds-RNA (molecole di RNA a doppia elica) è localizzato nel citoplasma delle cellule dell’ospite (Day *et al* 1977, Choi & Nuss 1992, Fahima *et al* 1993, Hillman *et al* 1995). Tale hypovirus è stato indicato con la sigla CHV. Il tipo Europeo è oggi riconosciuto con la sigla CHV1. Hoegger *et al.* (1999) hanno individuato in Europa 5 sottotipi di CHV1 dei quali uno (denominato sottotipo Italiano) è prevalente sugli altri. La presenza dei sottotipi di CHV1 in Europa è probabilmente legata

a introduzioni multiple dalla Cina e dal Giappone. Infatti i CHV asiatici presentano numerose analogie di sequenza con CHV1 Europeo (Peever *et al.* 1998).

Attualmente il CHV1, e con lui l'ipovirulenza esclusiva di *C. parasitica*, è presente nella maggioranza dei paesi Europei interessati dall'epidemia di cancro corticale, con l'eccezione dell'Austria e del Portogallo (Robin e Heniger, 2001), determinando in molti casi una forte regressione della malattia.

Come gli altri micovirus, il ds-RNA di *C. parasitica* non è in grado di infettare ife o sferoblasti dall'esterno ed è trasmissibile solo per anastomosi ifale (Anagnostakis & Day, 1979)

L'organizzazione genetica e la strategia di espressione degli *Hypovirus* è stata chiarita dalla caratterizzazione molecolare del CHV1-EP713 di origine francese (Hiremath *et al.*, 1986). La molecola è costituita da una doppia elica con un termine omopolimerico e l'altro eteropolimerico. Dalla conoscenza della struttura terminale è stato possibile sintetizzare cDNA corrispondenti ai domini terminali della molecola (Rae *et al.*, 1989) ed individuare la prima proteina coinvolta nel meccanismo dell'ipovirulenza (p29). L'analisi di sequenza dell'intera molecola di L -dsRNA ha evidenziato che solo il filamento poliadenilato (poli A) possiede i geni codificanti per alcune proteine. Su tale filamento sono stati identificati due regioni codificanti. La prima denominata ORF

A con un'estensione di 1869 nucleotidi codifica per la sintesi di una proteina di 29kDa chiamata convenzionalmente p29. Ulteriori ricerche hanno dimostrato che ORFA codifica per la sintesi di un altro polipeptide di 40kDa (p40) (Choi *et al.*, 1991). Probabilmente il frammento ORFA, porta l'informazione per la sintesi di una poliproteina di 69kDa che, per un processo autocatalitico mediato dalla p29, si scinde in quest'ultima più una di dimensioni maggiori di 40kDa (p40). Il secondo open reading frames denominato ORF B, con un'estensione di 9498 nucleotidi sembra coinvolto in un processo autocatalitico in cui si viene a formare un polipeptide di 48kDa denominato p48. L'esame della sequenza aminoacidica nel polipeptide p29 ha evidenziato una similitudine con la proteinasi HC-Pro dei *Potyvirus* del tabacco.

Ad ulteriore conferma di una origine comune fra il genoma di questo tipo di virus e quello costituito da dsRNA di *Hypovirus* contenuto nei ceppi ipovirulenti di *C. parasitica* è l'analogia di alcune poliproteine codificate dall'ORF B con la RNA elicasi e la RNA polimerasi dei *Potyvirus*.

Per meglio comprendere come i geni virali agissero direttamente su quelli di *C. parasitica*, isolati virulenti del fungo sono stati trasformati con costrutti contenenti cDNA corrispondente a parte o alla totalità del genoma virale. I risultati hanno evidenziato come in ORF A da solo non

sia in grado di attenuare la virulenza di *C. parasitica*. Tuttavia tale regione codificante regola:

- tutti i fattori che determinano la perdita della pigmentazione della colonia
- attenuazione della sporulazione
- attenuazione dell'espressione di alcuni geni fungini tra cui la laccasi

Tuttavia solo i ceppi transgenici che portano integrato nel genoma il cDNA corrispondente all'intera sequenza del dsRNA mostrano un'attenuazione della virulenza (Hillman *et al.*, 1989; Choi e Nuss, 1992).

La trasmissione dei CHV, avviene solo attraverso due vie: trasmissione verticale, per via agamica con spore asessuate (conidi), e trasmissione orizzontale per anastomosi ifale, ma non per via sessuale tramite ascospore (Anagnostakis, 1988; Zambonelli e Zecchini D'Aurelio, 1986). Non tutti i conidi comunque ricevono i CHV dal ceppo materno, limitando ulteriormente la loro diffusione in natura (Roane *loc.cit.*). Tuttavia il maggior ostacolo alla diffusione di CHV è rappresentato dall'incompatibilità vegetativa.

1.3-L'incompatibilità vegetativa

L'incompatibilità vegetativa è un sistema di riconoscimento messo in atto dai funghi al fine di regolare ed evitare lo scambio di materiale citoplasmatico e nucleare e particelle infettive tra un micelio e un altro.

Tale sistema è sotto stretto controllo genetico e spesso regolato da più loci. Per definizione la situazione di omozigosi a tutti loci che controllano tale fenomeno caratterizza la completa compatibilità. Per contro individui che mostrano eterozigosi ad uno o più loci vengono considerati incompatibili.

Da tale definizione si comprende come la trasmissione di CHV, e quindi la conversione dei ceppi virulenti in ipovirulenti, raggiunga il 100% di efficacia solo tra individui di *C. parasitica* appartenenti allo stesso gruppo di compatibilità vegetativa (gruppo vc). Per contro la situazione di eteroallelismo riduce la percentuale di trasmissione di CHV sebbene tale percentuale dipenda, sia dal numero e della interazioni tra i geni *vic* in condizione di eterotallismo, ma anche dal particolare gene *vic* considerato e, all'interno di esso dal tipo di allele presente nel donatore e nel micelio recipiente (Cortesi *et. al*, 2001). Tutto ciò spiega come la trasmissione di CHV si possa avere, seppure in misura ridotta, in condizioni di incompatibilità vegetativa. Tuttavia in termini generali dalle considerazioni sopra fatte, si deduce come l'efficacia nella trasmissione di CHV all'interno di una popolazione di *C. parasitica* non solo sia inversamente proporzionale al numero di gruppi vc presenti nella popolazione stessa, ma dipenda anche dai particolari gruppi presenti e dalle loro interazioni. Anagnostakis (1984) aveva ipotizzato un numero di geni *vic* che controllavano l'incompatibilità vegetativa in *C. parasitica*,

compreso tra 5 e 7, ai quali corrisponderebbero, considerando 2 alleli per locus, un numero di gruppi vc non inferiore a 32 e non superiore a 128. Un numero di loci polimorfici superiore a 6 è oggi l'ipotesi più accreditata, essendo stati individuati fino a 67 gruppi di compatibilità in Nord America (Anagnostakis *et al.*, 1986), 131 in Asia e 74 in Europa (Cortesi e Milgroom, 1999; Robin e Heiniger, 2001).

Tuttavia, differentemente da quanto accade in Nord America, dove in popolazioni anche limitate si ritrova un alto numero di gruppi vc (Anagnostakis *et al.*, 1986), in Europa la distribuzione dei gruppi vc è estremamente disomogenea; infatti è usuale ritrovare pochi gruppi dominanti in popolazioni su vaste aree geografiche (Robin e Heiniger, 2001). Tale situazione, come vedremo, ha probabilmente facilitato la diffusione di CHV nelle popolazioni Europee in confronto a quelle Nord Americane. In Italia, ad esempio, sono stati individuati ad oggi 20 gruppi di compatibilità; tuttavia 4 di essi, EU1, 2, 5 (nel Nord Italia) e EU12 (Sud Italia) sono dominanti nelle popolazioni di *C. parasitica* studiate (Cortesi *et al.*, 1996).

Le ragioni di tale disomogeneità è probabilmente legata alla scarsa ricombinazione genetica in queste popolazioni determinata dalle basse frequenze di riproduzione sessuata. Milgroom e Cortesi (1999), hanno evidenziato una correlazione positiva tra la diversità genotipica e il numero di strutture sessuali (periteci) osservate sui cancri in 10

popolazioni italiane di *C. parasitica*. La scarsa ricombinazione genetica e quindi la complessità nel numero di gruppi di compatibilità esistenti in una popolazione locale, sono probabilmente legati in Italia al forte disequilibrio esistente tra i tipi sessuali (Milgroom e Cortesi, 1999) e alla capacità di *C. parasitica* di riprodursi come organismo omotallico oltre che eterotallico (Milgroom *et al.*, 1993).

1.4- Strategie riproduttive

La differenziazione della polarità sessuale, negli Eumiceti, come per gli altri organismi vegetali, si ritrova o su un unico individuo o su due individui differenti. Ci saranno quindi forme comunemente dette omotalliche o autofertili e forme eterotalliche o autosterili. Certamente i singoli miceli possono presentare, nel caso di differente polarità, una grossa differenziazione sia morfologica che fisiologica o, in altri casi, essere completamente uguali ed essere allo stesso tempo complementari. Il ciclo sessuale di tutti gli Eucarioti presenta comunque sia la syngamia che la meiosi come elementi comuni, considerando comunque questi due processi come interdipendenti l'uno dall'altro; in quanto l'uno non può avvenire senza l'altro. Le specie eterotalliche presentano specifici tipi sessuali, in quanto i geni che sono espressi hanno delle funzioni che dipendono per l'espressione da altri geni ed alcuni hanno la funzione di trovare ed identificare gli altri elementi coinvolti nell'attività gametica e

di metterli in contatto. Pertanto hanno l'importante funzione di far completare il ciclo sessuale e la meiosi. Infatti la meiosi è inizialmente collegata con la sporulazione, in quanto le ascospore sono il prodotto immediato della meiosi.

Negli Ascomycota l'incompatibilità sessuale è regolata da un singolo locus con due alleli indicato come MAT (MAT-1 e MAT-2). Pertanto gli ascomicota eterotallici o self-incompatibili si incrociano soltanto tra isolati fertili di MAT-1 e MAT-2 (Copin *et al.* 1997; Kronstad and Staben, 1997) (Mc Guire, *et al.* 2003). Il MAT locus negli ascomiceti ha la caratteristica di avere alternati, questi alleli di diversa lunghezza, i quali presentano una gran parte di sequenze nucleotidiche non collegate tra loro, e allo stesso tempo hanno bisogno di un gran numero di diversi geni per completare il ciclo sessuale (McGuire, *et al.* 2003). Quindi, gli alleli al MAT locus sono stati definiti "idiomorfe" (Metzenberg and Glass, 1990). Per gli ascomiceti self-compatible (omotallici) i quali sono i più studiati, il Mat-1 e Mat-2 sono abitualmente presenti in un singolo nucleo, suggerendo che entrambe le idiomorfe sono necessarie per la piena riuscita del ciclo sessuale (McGuire, *loc.cit*). In generale, le idiomorfe dei Mat di *C.parasitica* ha la stessa organizzazione strutturale degli altri pyrenomycetes. Le idiomorfe degli altri pyrenomycetes ha un'estensione da 3.3 a 5.3 kb per il Mat-1 e da 2.4 a 3.8 kb per il Mat-2.

C.parasitica presenta invece tre open reading frames (ORF_s) per quanto riguarda le idiomorfe del Mat1-1(Mat1-1-1; Mat1-1-2; Mat1-1-3) e un solo ORF_s in Mat 1-2 (Mat1-2-1) (I.Cristina McGuire *et al*,2001).

Il sistema dei Mat in *C.parasitica* ha due caratteristiche che lo fanno essere insolito tra gli ascomiceti. *C.parasitica* infatti, presenta in laboratorio un tipico comportamento da self-incompatible (eterotallica), mentre, in campo, nella stessa popolazione si presentano sia fenomeni di outcrossing che fenomeni di selfing. Sono state osservate popolazioni dove approssimativamente il 25% dei periteci in ciascuna popolazione risultava da selfing (Marra, 1998; Milgroom *et.al.*,1993). Tali risultati hanno condotto Marra (1998) ad ipotizzare che entrambi i tipi sessuali potrebbero essere presenti nel nucleo dello stesso tallo e che i tipi sessuali possano scambiarsi prima del selfing. Comunque soltanto una idiomorfa (o Mat-1 o Mat-2) può essere ottenuta da ciascun isolato attraverso Southern hybridization e PCR (Marra and Milgroom, 1999).

Il modello di self-fertility che merita un esame più approfondito per *C.parasitica* è relativo a quelle forme di tipi sessuali che presentano heterokaryosi. Un dei studi più recenti sui tipi sessuali di *C. parasitica* (Anagnostakis, 1981) ha descritto un isolato proveniente dal campo (EP29) che si comportava come self-fertile nel laboratorio e capace di esprimere entrambi i mating-type. Dal confronto con il comportamento sessuale di altri funghi, self-fertility basata sul Mat heterokaryosis per

C.parasitica sorregge la somiglianza con la self-fertility descritta per alcuni funghi pseudohomotallici, come: *Neurospora tetrasperma*, *Podospora anserina*, *P. tetrasperma* o *Gelasinospora tetrasperma* (Dodge, 1927; Faretra, *et al.*, 1988; Fincham *et al.*, 1979; Raju and Perkins, 1994), Mat heterokaryosis in *C. parasitica* non è mantenuta regolarmente nella progenie delle ascospore. Infatti a differenza di quanto accade nelle altre specie heterokaryotiche, il modello per *C. parasitica* richiede che gli heterokaryons si formino ripetutamente tra individui in natura di diverso matyng-type. Comunque non è ancora conosciuto il meccanismo per la formazione dell'heterokaryon a livello della popolazione. La probabilità che l'heterokaryon si formi casualmente tra individui internamente a popolazioni di *C.parasitica* è estremamente bassa per due ragioni. Per primo, come in molti funghi filamentosi, l'heterokaryons si può formare soltanto tra individui che sono heterokaryon-compatibili, avendo gli stessi alleli a tutti i *vic* (o incompatibilità heterokaryotica, *het*) loci (McGuire *loc.cit*) *C. parasitica* ha un sano e ben definito sistema di incompatibilità vegetativa (Anagnostakis, 1982; Cortesi and Milgroom, 1998) che previene la formazione di heterokaryon in numerosi casi (Huber, 1996). Altrettanto importante, *vic* alleli e diversità genotipica risulta essere alta in numerose popolazioni (Milgroom and Cortesi, 1999) e limiterebbero la formazione casuale degli heterokaryon. In seconda analisi, il selfing osservato in

questo sistema è caratterizzato dalla carenza di segregazione ai loci del DNA fingerprint. Pertanto, la probabilità che nessuno di due individui compatibili vegetativamente, formanti un heterokaryon abbiano lo stesso fingerprint è estremamente bassa (I. Cristina McGuire, Robert E. Marra, and Michael G. Milgroom, 2004).

1.5- *Cryphonectria parasitica* nelle popolazioni italiane

La popolazione di *C.parasitica* in Italia è stata ampiamente descritta da Cortesi *et al.* (1996). La situazione Italiana prevede la presenza di 20 gruppi di compatibilità distribuiti in modo disomogeneo tra differenti aree geografiche ed in particolare tra il nord ed il sud della penisola (Figura 2). In particolare 4 gruppi sono risultati essere dominanti, tra i 20 gruppi distribuiti su tutto il territorio, e nel dettaglio, EU1, EU2 ed EU5 rappresentano la maggioranza degli individui del centro-nord, mentre EU12 è dominante nelle popolazioni del sud. Inoltre i valori degli indici di diversità genetica delle popolazioni come l'indice di Shannon, danno sempre dei valori relativamente bassi, evidenziando una bassa diversità in termini di gruppi di compatibilità.

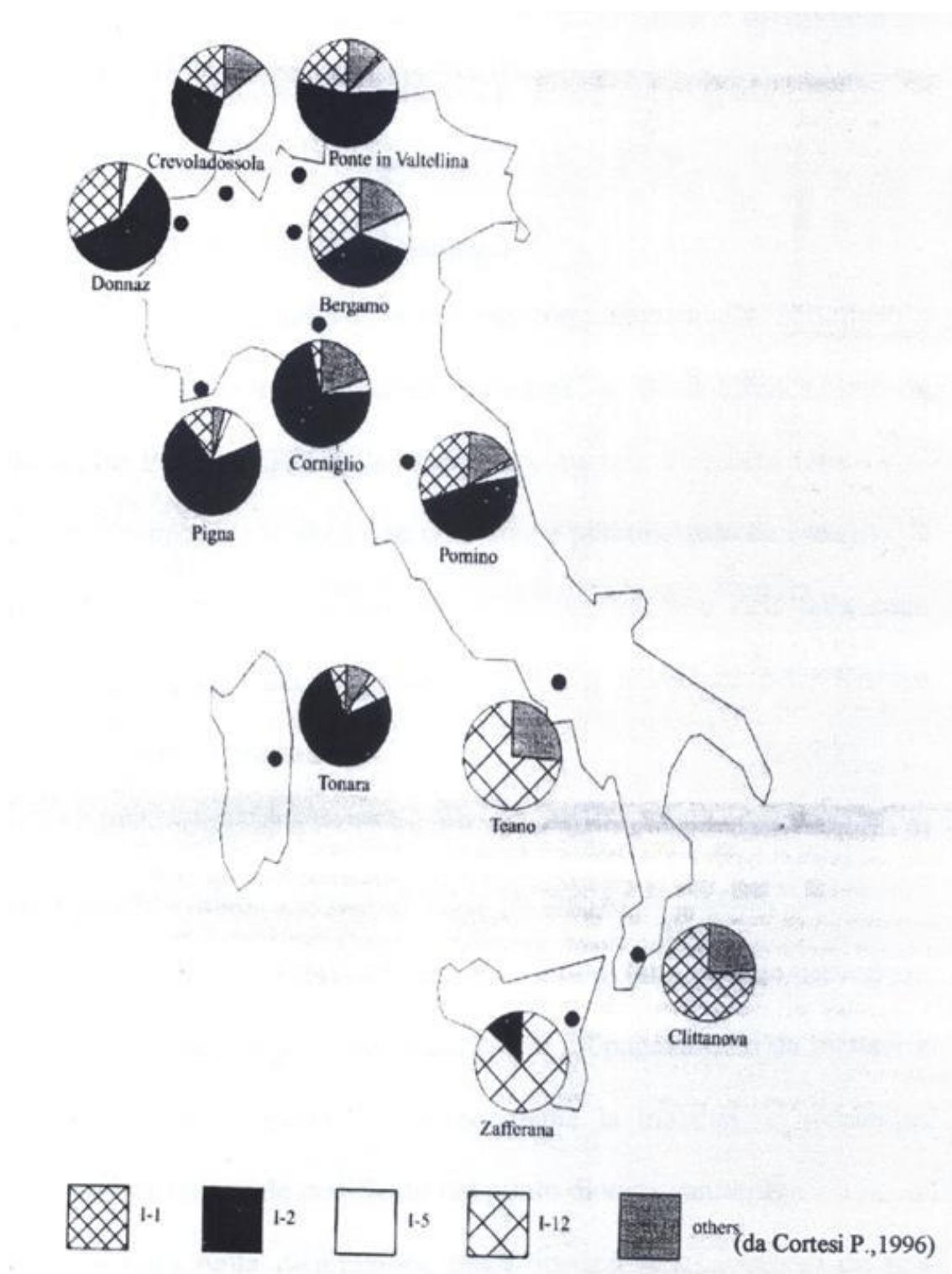


Figura 2 – Distribuzione dei 4 principali gruppi di compatibilità (I-1, I-2, I-5, e I-12) di *Cryphonectria parasitica* in Italia

1.5.1- Attuale situazione delle popolazioni di *C.parasitica* nel

Comprensorio dei monti Cimini

La maggior attività castanicola della provincia di Viterbo è concentrata nel Comprensorio dei Monti Cimini. Infatti la l'intera provincia occupa nel panorama nazionale una posizione di rilievo sia per la consistenza del patrimonio castanico sia in termini di superficie che di produzione, sia che si tratti di frutto, che di legname. Il cancro corticale del castagno si è diffuso su tutta la superficie castanicola del viterbese. Ad oggi si presenta in una fase di forte regressione rispetto alla situazione di emergenza che si era verificata 20 anni fa. Tale regressione si è avuta grazie alla massiccia diffusione dell'ipovirulenza esclusiva; che dal confronto dei dati ottenuti nel 1985 (Vannini A., 1985) a quelli ottenuti nel 2001 (Pasquini B., 2002) danno una fase stazionaria della diffusione. Tale fatto è legato inoltre alla presenza sul territorio di circa l'80% di cancri cicatrizzati, in aree come Poggio Croce di S. Martino e Monte Cimino. Per quanto riguarda la diffusione dei gruppi di compatibilità, sono stati individuati 6 gruppi di cui 3 appartenenti alla zona del centro-nord EU2 pari al 41% e gli altri 3 appartenenti alla zona del centro-sud EU12 pari al 23%; ponendo così l'intero Comprensorio come anello di congiunzione della penisola italiana per quanto riguarda la presenza dei vc-groups (Figura 3).

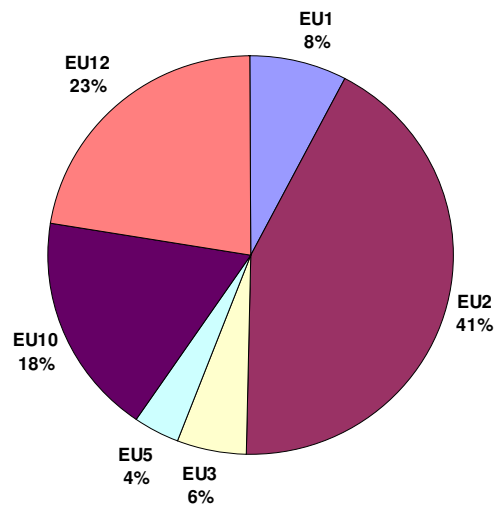


Figura 3- Distribuzione percentuale dei gruppi di compatibilità nel Comprensorio dei Monti Cimini

Conseguentemente se si considera la presenza di 5 loci polimorfici, alla luce dei 6 gruppi di compatibilità, tale fatto crea una situazione di grande pericolo e il reale rischio di differenziazione di nuovi gruppi di compatibilità vegetativa. Tale rischio si materializza in considerazione della co-presenza dei 2 tipi sessuali MAT-1 e MAT-2 nelle sub-popolazioni studiate (Pasquini B., 2002). Riguardo alla presenza delle fruttificazioni sessuate (periteci) al momento però non si hanno dati di riferimento per quanto riguarda la zona dei Cimini.

2. Scopo della tesi

Il lavoro di tesi di laurea del 2002, con titolo “Incidenza del cancro corticale del castagno nel comprensorio dei Monti Cimini e gruppi di compatibilità vegetativa nelle popolazioni di *Cryphonectria parasitica*” da me condotto, ed il lavoro del 1985 del Prof. Andrea Vannini dal titolo “Situazione attuale del cancro della corteccia del castagno nella provincia di Viterbo; con particolare riferimento alla diffusione dei ceppi ipovirulenti e alla loro caratterizzazione”, ci ha permesso di avere un’analisi completa dell’andamento del cancro corticale nel comprensorio dei Cimini negli ultimi 23 anni. Da questo si evince che nell’ultimo ventennio non ci sono state variazioni nella presenza del fenotipo alterato e quello normale, inoltre il comprensorio dei Cimini, per quanto riguarda la distribuzione dei vc-groups, presentando 6 gruppi di compatibilità vegetativa, e con 5 loci polimorfici, si pone per quanto riguarda la caratterizzazione dei vc-groups come anello di congiunzione tra la distribuzione dei vc-groups Europei del Nord Italia e la distribuzione dei vc-groups del Sud Italia. Ciò è reso possibile a seguito di attività forestali svolte da ditte provenienti da aree castanicole di altre regioni, in particolar modo dalla Campania (prov.di Salerno, Caserta ed Avellino), dall’Abruzzo (prov. Di Avezzano), dall’Umbria (prov. di Perugia), e da attività di utilizzazione delle ditte viterbesi nelle marche

ed in Emilia-romagna, di importazione di materiale legnoso come paleria, travame piccolo semilavorato proveniente dalla Calabria; per quanto riguarda le grosse travature invece vengono importate dalla Francia e dalla Romania; tutto il materiale legnoso viene stoccato in segheria e successivamente lavorato con gli attrezzi che gli operai poi riutilizzano negli stessi lavori forestali. Seppure la mortalità nei cedui castanili sembra essere praticamente nulla, e si ha una diffusione massiccia dell'ipovirulenza, la presenza di 6 gruppi di compatibilità e la conseguente individuazione di 5 loci polimorfici crea una situazione di pericolo nell'eventualità di una differenziazione di nuovi gruppi di compatibilità vegetativa e quindi una nuova fase epidemica della malattia soprattutto nel caso in cui il fungo sia capace di una fase riproduttiva di tipo sessuata nel nostro comprensorio. In quanto la riproduzione sessuata ha il potenziale di generare e mantenere la diversità dei gruppi di compatibilità con la ricombinazione di geni (*vic*) incompatibili vegetativamente (Yir-Chung Liu, Paolo Cortesi *et al.* 1996).

Scopo della presente tesi di dottorato è quello di analizzare la dinamica riproduttiva delle popolazioni di *C. parasitica* in ambiente naturale distribuite sull'intero territorio dei Monti Cimini, individuare la presenza dei periteci sui cancri e loro osservazione con attenzione alla

capacità di espulsione dei periteci e alla capacità di germinazione delle ascospore.

Al fine di determinare la diversità e la variazione genetica e trarre informazioni utili sull'attività riproduttiva nel nostro comprensorio si osserverà la progenie dei periteci e la si confronterà con se stessa e con i tester europei con delle prove di compatibilità vegetativa, al fine di constatare outcrossing, ed infine si procederà all'identificazione dei tipi sessuali, per confrontare la stima della diversità basata sul test di compatibilità con il test dei tipi sessuali.

3. Materiali metodi

3.1- Aree di studio

Le aree di studio sono state individuate nei boschi cedui del Comprensorio dei Monti Cimini (VT). Il ceduo è la forma di governo prevalente del comprensorio.

Sono state scelte tre aree della superficie di 1 ettaro per le quali si è proceduto alla descrizione attraverso i seguenti parametri:

- georeferenziazione con il GPS: latitudine, longitudine, esposizione ed altitudine;
- età, n° di ceppaie ad ettaro, n° di polloni presenti per ceppaia, diametro medio;
- estensione del cancro e diffusione sulla pianta.

3.2- Attività di campionamento

Per ogni area si è proceduti al prelevamento di 15 campioni e georeferenziazione di ogni singolo cancro campionato. Le tre aree oggetto di studio sono state indicate con la lettera A e B per l'area 1 (in quanto l'area 1 ricomprende due sottozone simili, distinte in A e B), D per l'area 2 e F per l'area 3.

Per ogni campione raccolto da singole ceppaie, si è osservato il tipo di cancro attraverso un'analisi visiva distinguendo in letali e non letali (Vannini A., 1985) ed è stato valutato lo stato fitosanitario, attraverso la misurazione dell'estensione del cancro e la posizione sulla pianta, del pollone stesso da cui è stato fatto il prelievo; è stato inoltre registrata la posizione del prelievo fatta fino ad un'altezza di 2mt da terra, considerando la pianta divisa in tre parti: colletto, 1,50 mt e 2 mt.

Le porzioni di tessuto corticale sono state prelevate con un coltello da innesto, raccogliendo le parti dove visibilmente era presente stroma, e per le parti prive di stroma, campionando tra i tessuti con evidente attacco del fungo, facendo molta attenzione a non andare a prelevare in zone dove era possibile avere materiale vecchio e poco vitale.

Il coltello è stato disinfettato con alcool etilico denaturato e poi sterilizzato con fiamma, durante ogni prelievo. I campioni raccolti sono stati registrati con la lettera P, in quanto il campionamento è stato fatto per reperire materiale con periteci, e la lettera relativa all'area con un numero progressivo da 1 a 15, ottenendo una sigla di questo tipo 1PA/1PD/1PF; si è così proceduto alla raccolta casuale dei 15 campioni di legno indicando per ciascuno di essi la presenza o assenza di stroma e la presenza o assenza di periteci. Ogni singolo campione è stato così posto in una bustina di plastica mono-uso e portato in laboratorio per procedere

con le fasi successive. Da ogni pianta da cui è stato raccolto l'isolato si sono ricavati i seguenti dati:

- latitudine, longitudine (per un'eventuale carta della diffusione della malattia);
- tipo di cancro (letale o non letale)
- dimensione del cancro.

3.3- Attività di laboratorio

Per quanto riguarda le attività di laboratorio sono state previste tre fasi:

1. studio della biologia e dell'attività riproduttiva del fungo:
 - a) osservazione della presenza di periteci sui cancri e andamento della produzione e maturazione dei periteci nello stroma;
 - b) capacità di espulsione delle ascospore;
 - c) valutazione del grado di maturità della parete dei periteci;
 - d) conta delle ascospore ;
 - e) analisi delle Unità Formanti Colonie (CFU);
2. studio delle colonie sviluppate e loro progenie:
 - a) morfologia delle colonie;
 - b) test di compatibilità della progenie;

- c) test di compatibilità della progenie con i v-c groups europei tipici del comprensorio ;

3. analisi molecolari:

- a) determinazione dei tipi sessuali della progenie;
- b) osservazione di heterokaryon.

3.4- Isolamento e osservazione dei periteci

I campioni di tessuto corticale sono stati riportati in laboratorio e con l'ausilio di un bisturi e una pinzetta, sono stati preparati, prendendo per tutti circa 10 cm² di campione, dopo essere stati lavati superficialmente con acqua sterile per 1-2 secondi, per evitare la germinazione di altre spore fungine presenti eventualmente sulla superficie. Si è proceduti al trasferimento di ogni singolo campione in camera umida, preparata con carta Bibula imbevuta di 1 ml di acqua distillata sterile per mantenere il 100% di umidità relativa (RH), inserita in Capsula Petri (Ø 90 mm) sulla quale era stato posta preventivamente la relativa sigla, di ogni singolo campione, tutto confezionato in casse di plastica inserite all'interno di sacchetti di plastica, sigillati, e posti per 4 settimane in cella di crescita in ambiente controllato, con temperatura costante di 25°C, umidità standard e fotoperiodo di 12 ore (Guerin, *et al.* 2001). La prima osservazione della presenza assenza di stroma e presenza e assenza dei periteci è stata fatta durante l'allestimento della prova e le osservazioni sono state fatte allo

stereoscopio (Zeiss x40); dopodiché settimanalmente sono state fatte le successive verifiche della crescita dei colli dei periteci e della formazione dello stroma.

3.4.1- Capacità di espulsione delle spore

Su di ogni campione, allestito in camera umida in capsula Petri è stato posto un vetrino ad una distanza 1 cm, imbevuto su di un lato di olio di vasellina (Sigma), per valutare la capacità di espulsione di ascospore dai periteci maturi. Le spore che vengono rilasciate rimangono aderenti al vetrino per poter essere osservate con cadenza settimanale, per la durata di un mese (Guerin, *loc.cit.*).

3.4.2- Osservazione del grado di maturazione della parete dei periteci

Il grado di maturazione della parete dei periteci, è stato descritto in base alla colorazione della parete del peritecio che è posizionato all'interno dello stroma, come:

maturato: il peritecio con parete grigio chiaro, grigio scuro e nero;

immaturato : il peritecio con parete bianca.

Tale classificazione si è basata sull'osservazione soggettiva della parete del peritecio, fatta allo stereoscopio al termine di 4 settimane. Sono stati osservati casualmente 10 periteci in quei campioni che allo

scadere della quarta settimana presentavano un numero di colli dei periteci superiore a 5 e sono stati osservati tutti i periteci che presentavano un numero inferiore di colli a 5.

Con un bisturi e con l'aiuto di un'ansa sono stati prelevati i periteci, uno ad uno e posti in una gocciolina di acqua sterile per essere dilavati completamente dalla massa di conidi in cui sono immersi. Al termine delle osservazioni per la maturità della parete, sono stati presi 15 periteci, casualmente, per ogni area, con molta cautela e facendo molta attenzione a non romperli; sono stati completamente lavati e, sono stati posti in una eppendorf (2,5 ml) sterile con 1 ml di acqua distillata sterile per le osservazioni successive.

3.4.3- Conta delle spore

Ogni singolo peritecio è stato così posto in tubi di vetro con 10 ml di acqua sterile, successivamente sono stati agitati al vortex energicamente, in modo di avere una rottura della parete e la dispersione delle ascospore nella soluzione. Da questo è stata prelevata una gocciolina dalla sospensione “*tal quale*” e con la camera di Thoma –Zeiss, al microscopio ottico con ingrandimento 40x sono state registrate le spore presenti nel reticolo. Si ricorda che tale metodo non permette di distinguere le cellule vive da quelle morte e inoltre

l'attendibilità del metodo è legata a densità di spore per ml superiori a 10^6 .

3.4.4- Conta delle Unità Formanti Colonie (CFU)

La stessa soluzione “*tal quale*” utilizzata per la conta in vitro, è stata utilizzata per la conta in vivo. Sono stati prelevati 0,2 ml di soluzione “*tal quale*” contenente il peritecio, con pipetta Gilson, è stato eseguito uno striscio in piastre Petri (\varnothing 90 mm) contenenti agar-acqua al 2% (Guerin, 2001) per una coltura monosporica, il tutto registrato con la sigla del campione corrispondente e sono state incubate al buio a 24°C; dopo 18 h le colture sono state osservate allo stereoscopio per verificare la germinazione delle spore. L'osservazione è stata fatta al massimo nell'intervallo delle 20 h dopo l'inoculo in quanto, dopo le 24 h iniziano a germinare anche eventuali conidi presenti che non sono stati lavati dal peritecio di partenza. Successivamente sono state osservate le piastre allo stereoscopio e si è proceduto al conteggio delle spore germinate. Di queste è stato prelevato il 20% e posto in piastre Petri (\varnothing 90 mm) contenenti PDA (Potato Dextrose Agar) e streptomicina (0,006 g/l) ed incubate per 2 giorni a 24°C. Allo scadere dei giorni di incubazione sono state osservate le CFU (Unità Formanti Colonie) sviluppate.

3.4.5- Morfologia delle colonie

Le colonie sviluppate sono state tutte numerate considerando l'area da cui è stato prelevato lo stroma, il pollone, il peritecio e la morfologia della parete del peritecio, in modo di avere una sigla del tipo: es. 14PA2N1 dove il numero sottolineato sta ad indicare la CFU di partenza. Le 15 progenie che sono state analizzate per ogni peritecio di ogni singola area sono state scelte random tra tutte le ascospore che hanno sviluppato CFU. La caratterizzazione morfologica è stata fatta considerando:

normale la colorazione arancione della colonia e copiosa fruttificazione picnidica;

bianco micelio bianco con scarsa o assente fruttificazione picnidica;

intermedio micelio scarsamente pigmentato e scarsa fruttificazione picnidica rispetto al tipo normale;

crema con micelio con crescita irregolare, lenta e andamento del micelio sommerso (Granata, *et al.*1992).

Per procedere all'analisi della morfologia della progenie, le colonie sono state allevate su un substrato di PDA per 7 giorni con alternanza di buio e luce a 24°C. Sono state fatte tre repliche per ciascun campione.

3.4.6- Test della compatibilità tra la progenie

I test di compatibilità della progenie sono stati condotti tra la progenie dello stesso peritecio, secondo il protocollo di Anagnostakis (1977) successivamente modificato da Anagnostakis *et al.*, 1988. Sono state costruite delle matrici per ogni progenie effettuando tutti i possibili incroci tra i ceppi. Le piastre di PDA recanti 6 confronti per piastra con tondini di micelio di 0,5 cm di diametro sono stati messi a confronto ponendoli alla distanza di circa 2-4 mm sulla piastra. Ogni piastra è stata replicata due volte. Le piastre sono state incubate per 7 giorni a 24°C con alternanza di buio e luce. La valutazione della compatibilità vegetativa è stata fatta utilizzando la tecnica del “barrage” (Puhalla and Anagnostakis, 1971; Anagnostakis, 1982c). I confronti che presentavano sul lato di contatto una netta linea di demarcazione spesso delimitata da fruttificazioni picnidiche (barrage), sono stati considerati incompatibili, per contro i confronti che presentavano una completa fusione dei miceli sul lato di contatto e l’assenza di produzioni picnidiche delimitanti, sono stati considerati compatibili.

Per il test di compatibilità vegetativa con i tester europei, sono stati considerati i tester più rappresentativi in Italia e, precisamente EU1, EU2, EU3, EU5, EU12. Tali tester sono stati gentilmente forniti dal Prof. Paolo Cortesi dell’Istituto di Patologia Vegetale dell’Università di

Milano. Le prove sono state condotte come in precedenza per il test della compatibilità tra la progenie, effettuando tutti i possibili incroci tra i ceppi e i tester replicandoli due volte. In ciascuna piastra ogni isolato è stato confrontato con i 6 tester europei, per un totale di 6 confronti per piastra. Per avere un'ulteriore verifica della compatibilità con i tester europei è stato utilizzato un terreno di coltura e quindi delle piastre su cui sono stati replicati i test di compatibilità a base di PDA con aggiunta di 0,05 g/lt bromocresol, 2g/lt yeast extract, 7 g/lt estratto di malto, 0,8 g/lt acido tannico, 0,1 g/lt metionina, 0,002g/lt biotina, 0,002g/lt diammina, 5 g/lt agar preparato secondo la formula di Powell. Il bromocresolo viene utilizzato nelle prove di compatibilità vegetativa, in quanto, al contatto della ife di due miceli diversi e incompatibili si forma una linea di barrage che ha una variazione di colore determinato da un viraggio di ph.

3.5- Determinazione dei tipi sessuali

La determinazione del tipo sessuale (mating type MAT) è stata effettuata seguendo il metodo di McGuire *et al.* (2001), il quale utilizza due coppie di primer specifici in una reazione di amplificazione a catena del DNA gnomico (PCR). Il locus *MAT* in *C. parasitica* presenta due alleli, *MAT-1* e *MAT-2*, estremamente diversi in lunghezza e sequenza nucleotidica, similmente ad altri Ascomycota. Le due coppie di primer

specifici utilizzate per l'amplificazione di *MAT-1* e *MAT-2*, sono state disegnate da McGuire *et al.* (2001) e sono rispettivamente: M1-GS1 (5'-GACATCACAAGTCGGCTCCCAC-GAACAG-3') e M1-GS2-rev (5'-TATTAATCGCCGC-3') per *MAT-1*; M2-GS2 85'-GGAAGTTGGGTCCAAAATATGGGTACAG-3') e InvA5n (5' – TGATGTCGGCAGCCTT-3') per *MAT-2*. M1-GS1 e M1-GS2 rev amplificano un prodotto di 2079 bp e si anellano rispettivamente in posizione 247-2443 e 557-584 sul *MAT-2*.

Si è proceduti seguendo tre fasi ben distinte:

Estrazione del DNA dal micelio

Amplificazione del DNA bersaglio

Separazione su gel di agarosio

1) Estrazione del DNA dal micelio

Il DNA totale è stato estratto direttamente dal micelio cresciuto in coltura pura utilizzando la metodologia descritta da Cenis *et al.* (1992), ottenendo DNA in quantità e purezza sufficiente per l'amplificazione.

Di seguito vengono indicate le soluzioni utilizzate per l'estrazione.

Soluzioni :

- Buffer di estrazione: Tris-HCl 200 mM, pH 8.5, NaCl 250 mM;
- EDTA 25 mM, 0.5% SDS;
- Sodio acetato 3M, pH 5.2;
- Isopropanolo al 100%;

- Etanolo al 70%;
- 1 x TE: Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8.0.

Il micelio fungino è stato messo a crescere in una provetta tipo eppendorf da 1.5 ml con 500µl di Brodo di Patata Destrosio (PDB) per 3 gg ad una temperatura di 30°C. Il micelio così cresciuto è stato centrifugato per 10 minuti a 10.000 x g a 4°C di temperatura in una microcentrifuga (Beckman), il surnatante è stato scartato e il micelio è stato lavato con 500µl di **TE**, e centrifugato nuovamente. Dopo aver scartato il surnatante, il micelio è stato congelato immergendo la provetta in azoto liquido, oppure in una soluzione di alcool denaturato e ghiaccio secco per alcuni secondi. Successivamente il micelio viene frantumato finemente con un micropestello fino ad ottenere una polvere sottile. La polvere è stata sospesa in 300µl di **buffer** di estrazione e sono stati aggiunti 150µl di **Na acetato 3M** e, dopo aver agitato brevemente, la sospensione è stata lasciata ad incubare per 10 minuti ad una temperatura di -20°C. Dopo l'incubazione la sospensione è stata centrifugata a 4°C a 10.000 x g per 15 minuti. Il surnatante è stato recuperato e posto in una nuova provetta. Al fine di precipitare il DNA sono stati quindi aggiunti 450µl di **isopropanolo** e dopo una incubazione di 5 minuti a temperatura ambiente, il precipitato è stato centrifugato sempre a 4°C a 10.000 x g per 15 minuti. Scartato il

surnatante il pellet è stato lavato con 50µl di **etanolo** al 70% e successivamente centrifugato. Eliminati l'etanolo, il pellet è stato fatto asciugare per 5 minuti all'aria e quindi sospeso in 50µl di **TE** e conservato a -20°C.

Per quanto riguarda la quantificazione del DNA è stata fatta osservando la fluorescenza agli UV di 1µl di campione su una piastra di agarosio con bromuro di etidio (10mg/ml).

2) Amplificazione del DNA bersaglio

Il DNA estratto è stato sottoposto ad amplificazione tramite la reazione a catena della polimerasi PCR. La tecnica della PCR si basa sull'amplificazione di tratti di DNA, che vengono riconosciuti da oligonucleotidi specifici (o casuali) (primers), per azione dell'enzima *Taq*DNA-polimerasi, tramite numerosi cicli termici. La *Taq*DNA-polimerasi ha un optimum di attività a 72°C e non viene inattivata dalle temperature necessarie per denaturare il DNA durante l'amplificazione.

E' molto importante ottimizzare, nel processo della PCR, alcuni fattori per avere una buona riuscita dell'amplificazione, quali:

- concentrazione di DNA usato nella reazione;
- lunghezza dei primer;
- concentrazione di Mg^{++} nel tampone di reazione;
- temperatura e tempi di reazione usati nei cicli di reazione.

Generalmente un ciclo di amplificazione ha inizio con la denaturazione del DNA a 92°-94°C; successivamente si ha una fase a 35-55°C, dipendente dalle caratteristiche dei primer, in questo caso si ha l'attacco (annealing) dei primer alle sequenze omologhe sul DNA templare e si termina con un passaggio a 72°C dove si attiva l'enzima *Taq*DNA-polimerasi. La funzione di questo enzima è quella di catalizzare l'allungamento del primer usando come impronta la molecola di DNA a cui il primer stesso si è ibridato. Questo ciclo di denaturazione – annealing- allungamento, viene ripetuto finché non si ottiene un numero elevato di copie del tratto di DNA che interessa.

I prodotti così amplificati vengono separati, in base al peso molecolare, con elettroforesi su gel di agarosio ed evidenziati con dei coloranti.

Le reazioni di PCR sono state ottimizzate con l'uso di Ready to Go PCR-BeadsTM (Amersham Pharmacia Biotech), in cui si trovano, in provettine da 0,5 ml, soluzioni di reagenti liofilizzati per ogni singola reazione da 25µl, ogni reazione contiene:

- 1,5 unità di *Taq*-polimerasi;
- 10 mM Tris-HCl , pH 9;
- 50 mM KCl;
- 1,5 mM MgCl₂ ;
- 200 mM per ogni dNTP;

tale miscela è stata portata a volume aggiungendo 23 μl di H_2O distillata e sterile ed 1 μl di DNA (~50 ng).

L'amplificazione è stata realizzata utilizzando un Perkin Elmer DNA Thermal Cycler con il seguente programma:

⇒ denaturazione a 95°C 30 secondi

a cui sono seguiti 30 cicli programmati di:

⇒ denaturazione a 95°C 30 secondi

⇒ allungamento a 66°C 1 minuto

⇒ estensione a 72°C 4 minuti

3) Separazione su gel di agarosio e individuazione del tipo sessuale

La separazione dei prodotti di amplificazione è stata ottenuta su mini-gel di agarosio (1,5%) in celle elettroforetiche Amersham-Pharmacia. I prodotti di amplificazione sono stati caricati nel gel insieme ad 1 μl del marcatore 1Kb Plus DNA Ladder, (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) e separati mediante elettroforesi in tampone TAE. Dopo la separazione il gel è stato osservato a transilluminatore UV (Spectroline modello TM-312A) e fotografato.

3.6- Studio della progenie con heterokaryon

Per determinare se gli isolati sono heterokaryon e quindi presentano entrambi i tipi sessuali, sono state fatte delle colture monoconidiche in substrato di agar-acqua al 2% incubate a temperatura di 24°C della progenie oggetto di studio, assumendo per certo che i conidi di *C.parasitica* sono uninucleati. Dalle monoconidiche sono state prelevati un singolo conidio germinato e un apice ifale, ripassati in terreno di PDA e posti in crescita per 7 giorni a temperatura costante di 24°C. Successivamente si è proceduti alla determinazione dei tipi sessuali di ogni replicato indicato come conidio e come apice ifale come nel paragrafo precedente.

3.7- Elaborazione statistica dei dati

La diversità allelica (h) per ciascun gene *vic* è stata calcolata con la formula:

$$h = n(1-p^2-q^2)/(n-1)$$

dove n è il numero dei campioni, p la frequenza dell'allele 1 e $q(1-p)$ la frequenza dell'allele 2.

Le analisi di regressione e le elaborazioni grafiche sono state effettuate con il pacchetto statistico GraphPad Prism (GraphPad Software Inc.).

4. Risultati

4.1- Aree di studio

La figura 4 mostra la dislocazione delle 3 aree prese in esame nel Comprensorio dei Monti Cimini.

Sono stati considerati tre settori principalmente, quello nord-occidentale indicato con le lettere A e B, quello nord-orientale contrassegnato con la lettera D e quello meridionale con la lettera F. Tali settori sono ricongiungibili agli studi fatti nel 2001 e quelli precedenti del 1985, in modo di avere un serie storica dei dati a disposizione.

Le tabelle 1 e 2 descrivono le caratteristiche stazionali e selvicolturali delle 3 aree studiate. Si tratta tutti di castagneti cedui di età compresa tra 15 e i 20 anni. Per quanto riguarda l'area 1 dal numero di polloni presenti sulle ceppaie, 3-4, e dal diametro medio dei polloni, 18, si desume che sia prossima all'utilizzazione selvicolturale; mentre l'area 2 e 3 presentano un numero di polloni ancora alto. In tutte le aree si è osservata una forte presenza di attacchi di cancro corticale.

Tabella 1- Caratteristiche stazionali delle aree di saggio

AREA 1	AREA 2	AREA 3
<i>Comune</i> : S.Martino al Cimino	<i>Comune</i> : Soriano nel Cimino	<i>Comune</i> : Ronciglione
<i>Località</i> : Macchia dell'Ospedale-Montagna	<i>Località</i> : Piangoli – Acqua Grande	<i>Località</i> : Poggio dei Sorci
<i>Esposizione</i> : N-E	<i>Esposizione</i> : N-E	<i>Esposizione</i> : -
<i>Governo</i> : ceduo matricinato	<i>Governo</i> : ceduo matricinato	<i>Governo</i> : ceduo matricinato
<i>Superficie</i> : 10000 mq	<i>Superficie</i> : 10000 mq	<i>Superficie</i> : 10000 mq
<i>Latitudine</i> : 42°22'383''-42°23'260''	<i>Latitudine</i> : 42°24'186''	<i>Latitudine</i> : 42°17'083''
<i>Longitudine</i> : 12°08'421''-12°09'021''	<i>Longitudine</i> :12°11'474''	<i>Longitudine</i> : 12°10'901''
<i>Pendenza</i> : 10°	<i>Pendenza</i> : 20°	<i>Pendenza</i> : 0°
<i>Altitudine</i> : 609-637	<i>Altitudine</i> : 603	<i>Altitudine</i> : 570

Tabella 2 – Caratteristiche selvicolturali delle aree di saggio

<i>Area</i>	<i>Età</i>	<i>Polloni per ceppaia</i>	<i>Diametro medio polloni</i>	<i>Altezza media</i>	<i>Copertura</i>	<i>Ceppaie/ha</i>	<i>Matricine/ha</i>	<i>Governo</i>
1	20	3-4	18	16,68	70%	280	100	Ceduo castanile
2	17	8-12	15,77	11,96	80%	300	200	Ceduo castanile
3	15	10-12	13,12	13,12	80%	280	200-250	Ceduo castanile

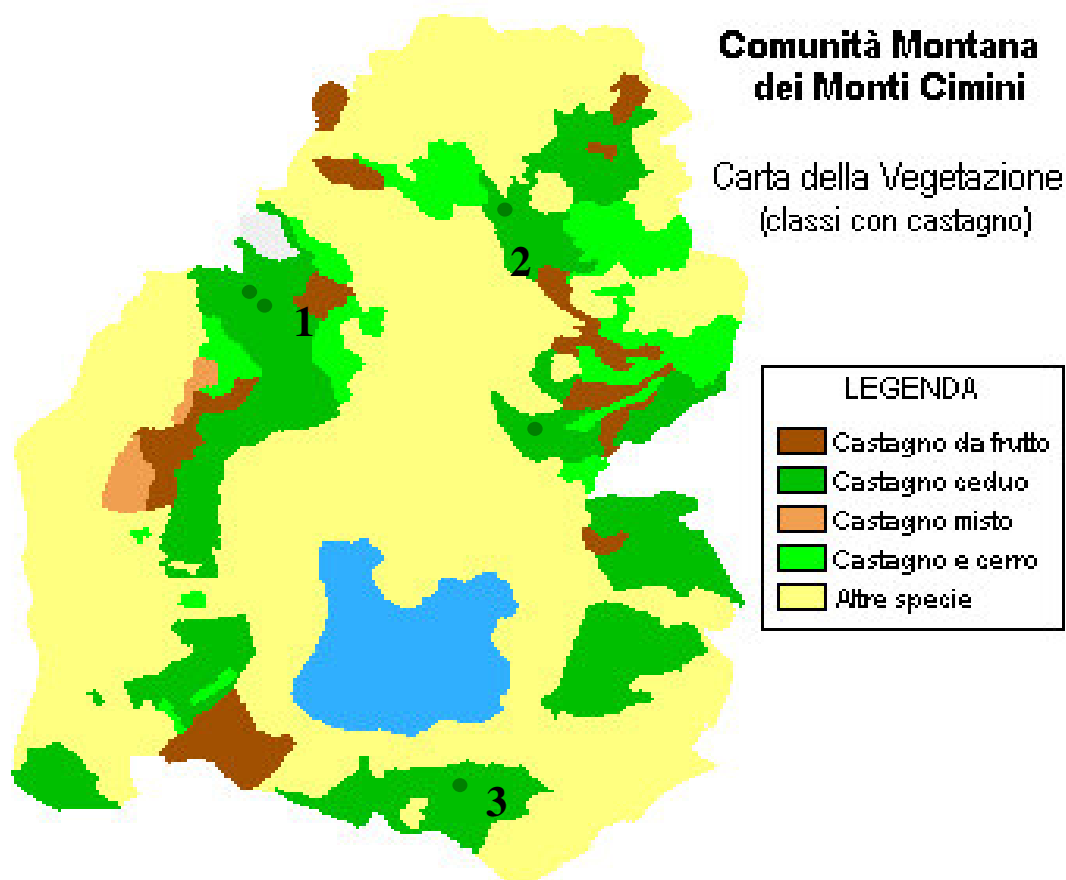


Figura 4- Dislocazione delle tre aree prese in esame nel Comprensorio dei Monti Cimini

4.2- Attività di campionamento

Nelle tabelle 3,4,5, sono riportati per ciascun campione prelevato, le dimensioni del cancro e la posizione sul pollone.

Il campionamento è stato selettivo per la presenza degli stromi che erano presenti soprattutto su cancri letali (34/38). Solo 4 cancri non letali presentavano stroma.

Tabella 3- Dimensioni e posizione sul pollone dei cancri con stroma campionati nell'area 1

Area 1	Dimensioni del cancro		Altezza sulla pianta
	Cancro	L(cm) l (cm)	
	1PB	62,8 40	1,20 mt
	2PB	58,09 100	2,00 mt
	3PB	53 45	1,60 mt
	4PB	52 80	2,20 mt
	5PB	48 10	1,75 mt
	6PB	49 20	2,30 mt
	7PB	40 15	1,40 mt
	8PB	20 12	0,80 mt
	9PA	54,95 13	Colletto
	10PA	Materiale a terra	
	11PA	52 17	2,20 mt
	12PA	47 100	Colletto
	13PA	25 45	1,40 mt
	14PA	Materiale a terra	
	15PA	Materiale a terra	

L= larghezza(arco di circonferenza) del cancro del pollone espressa in cm

l = altezza del cancro sul pollone espressa in cm

Tabella 4- - Dimensioni e posizione sul pollone dei cancri n stroma campionati nell'area 2

Area 2	Dimensioni del cancro		Altezza sulla pianta
	Cancro	L(cm) l (cm)	
	1PD	20 10	colletto
	2PD	37 10	colletto
	3PD	30 20	1,20 mt
	4PD	15 20	1,70 mt
	5PD	28 45	1,60 mt
	6PD	22 6	1,25 mt
	7PD	28 20	1,30 mt
	8PD	25 12	Colletto
	9PD	21 8	2,20 mt
	10PD	38 13	2,20 mt

L= larghezza (arco di circonferenza) del cancro del pollone espressa in cm

l = altezza del cancro sul pollone espressa in cm

Tabella 5- Dimensioni e posizione sul pollone dei cancri con stroma campionati nell'area 3

Area 3	Dimensioni del cancro		Altezza sulla pianta
	Cancro	L(cm) l (cm)	
	1FP	12 60	1,20 mt
	2FP	15 60	2,00 mt
	3FP	18 25	1,20 mt
	4FP	15 30	Colletto
	5FP	14 45	1,00 mt
	6FP	15 20	Colletto
	7FP	25 21	Colletto
	8FP	35 28	Colletto
	9FP	10 13	Colletto
	10FP	15 60	Colletto
	11FP	17 12	1,20 mt
	12FP	25 45	Colletto
	13FP	28 42	2,20 mt

L= larghezza (arco di circonferenza) del cancro del pollone espressa in cm

l = altezza del cancro sul pollone espressa in cm

Nelle tabelle 6, 7, 8 sono riportati i dati relativi al numero di periteci per cm² osservati sui cancro letali e non letali campionati rispettivamente nelle Aree 1, 2 e 3, con la relativa media per ogni area.

Nella tabella 9 sono state riportate le percentuali relative ai campioni con stroma ma senza periteci e campioni con stroma con periteci.

TABELLA 6 – Numero di periteci per cm² osservati al tempo T0 (23 Aprile 2007) sui cancro campionati nell'Area 1

AREA 1	N° periteci /cm ²	
Codice cancro	Stroma da cancro letali	Stroma da cancro non letali
1PB	0,8	
2PB		0,1
3PB	0,5	
4PB	0,4	
5PB	1,6	
6PB	0,0	
7PB	0,0	
8PB	0,2	
9PA		0,0
10PA	0,9	
11PA	0,3	
12PA	0,0	
13PA	0,1	
14PA	3,2	
15PA	0,1	
Media	0,62	0,05

TABELLA 7- Numero di periteci per cm² osservati al tempo T0 (23 Aprile 2007) sui cancri campionati nell'Area 2

AREA 2	N° periteci /cm ²	
Codice cancro	Stroma da cancri letali	Stroma da cancri non letali
1PD	0,0	
2PD		0,1
3PD	0,2	
4PD	0,2	
5PD	0,1	
6PD	0,0	
7PD	0,0	
8PD	0,2	
9PD		0,0
10PD	3,7	
Media	0,44	0,05

TABELLA 8 - Numero di periteci per cm² osservati al tempo T0 (23 Aprile 2007) sui cancri campionati nell'Area 3

AREA 3	TIPO DI CANCRO	
Codice cancro	Stroma da cancri letali	Stroma da cancri non letali
1FP	13,3	
2FP	0,0	
3FP	18,9	
4FP	0,4	
5FP	0,1	
6FP	3,1	
7FP	0,0	
8FP	1,1	
9FP	0,2	
10FP	0,0	
11FP	0,0	
12FP	0,0	
13FP	0,0	
Media	2,9	

TABELLA 9- Frequenze dei campioni con stroma con periteci e senza periteci

	Area1	Area 2	Area 3
<i>Freq.campioni con stroma senza periteci</i>	26,66%	40%	40%
<i>Freq. campioni con stroma con periteci</i>	73,33%	26,67%	46,67%

4.3- Osservazione diretta dei periteci

Nella figura 5 è riportato il numero dei colli dei periteci osservabili sulla superficie degli stromi al tempo TO, T9, T16 e T23 da cui si evidenzia un andamento esponenziale sia su stromi da cancro letali che non letali. Tuttavia la curva per quanto riguarda i cancro non letali appare più appiattita. Si osserva inoltre che anche nei campioni non letali ci sono dei colli che maturano ma non con lo stesso incremento come per i non letali.

La figura 6 riporta il numero di ascospore espulse dai colli dei periteci contate sui vetrini per le tre aree al tempo T9, T16, T23; in questo caso non ci sono osservazioni di espulsione di ascospore da stromi di cancro non letali; al tempo T9 l'espulsione di ascospore è stata osservata solo su 2 stromi (14PA e 1PF) su 38 totali (5.3%) e su stromi (5PB, 8PA, 6PF) su 38 totali (7.9%) al tempo T16. Infine nell'ultimo controllo al tempo T23 non sono state espulse ascospore da nessuno stroma. In totale al tempo T9 sono state rilasciate 138 ascospore e al tempo T16 106 (figura 3).

Figura 5- Numero dei colli dei periteci ai Tempi T0; T9; T16; T23

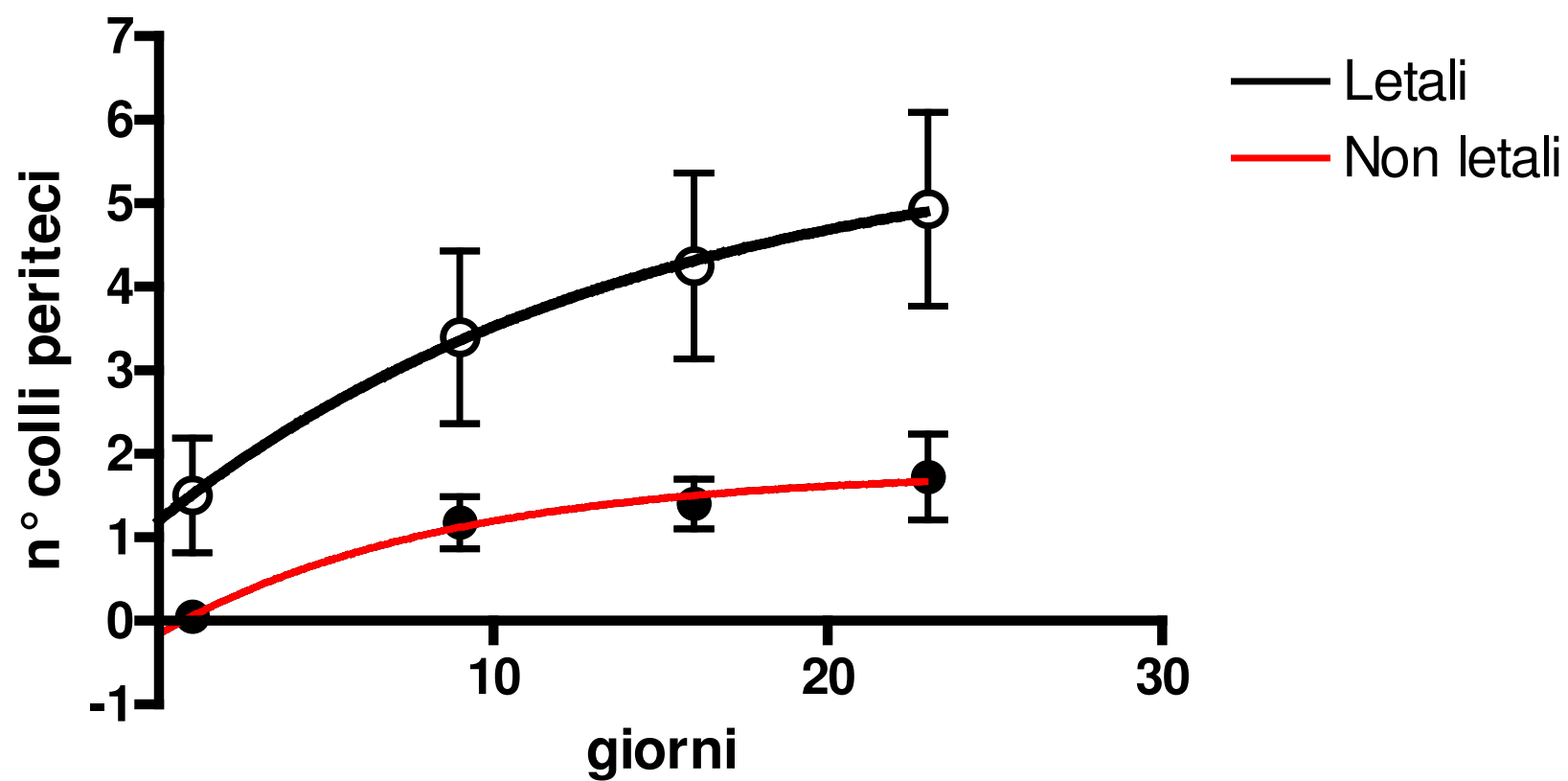
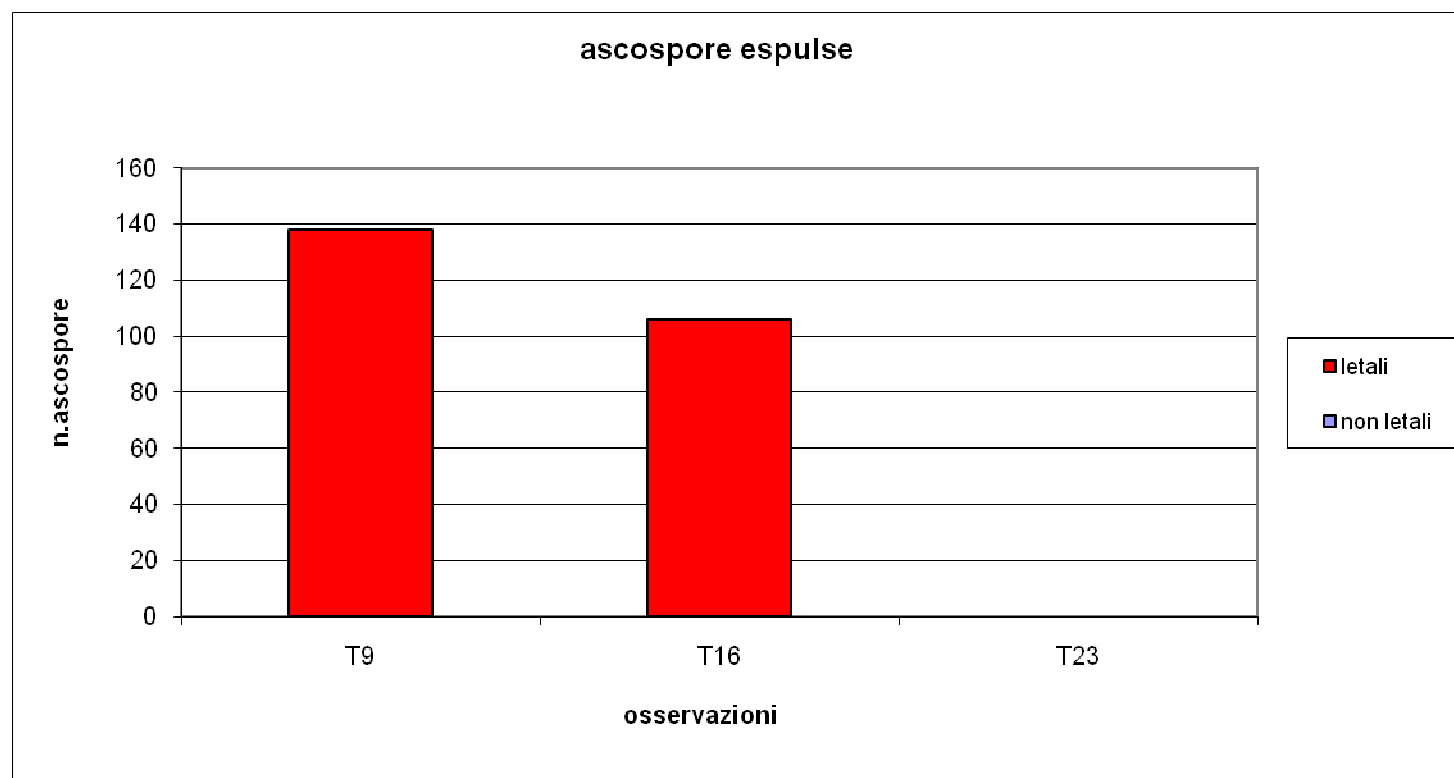
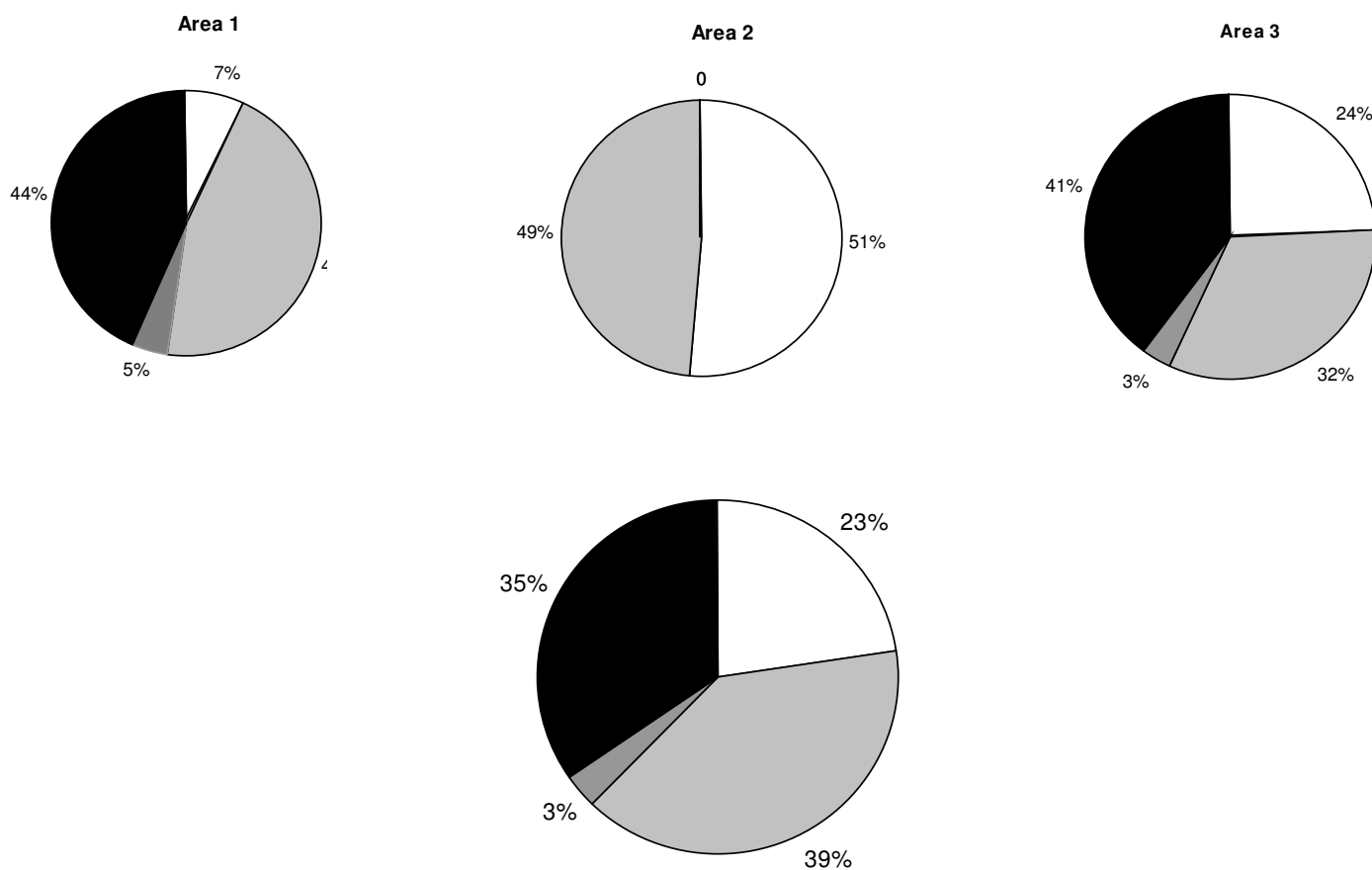


Figura 6- Controllo del numero delle spore espulse nelle 3 settimane di osservazione



Lo stadio di maturazione della parete dei periteci al termine delle 3 settimane (tempo T23) è mostrata nella figura 7. Il 56, 49 e 76% dei periteci mostravano parete matura rispettivamente nelle aree 1, 2 e 3. In media per le tre aree il 77% dei periteci mostrava parete matura.

Figura 7 –Percentuale dello stadio di maturità delle pareti dei periteci
Bianco: immatura; Grigio chiaro, grigio scuro e nero: matura



4.4- Conta delle cellule in vitro ed in vivo

Per ogni singola area sono stati presi in considerazione un totale di 15 periteci per un totale delle tre aree di 45. Dal conteggio delle spore presenti in ogni peritecio osservato attraverso la camera di Thomas –Zeiss si è ottenuta una concentrazione di ascospore per peritecio nell'area 1 (tabella 10) che va da un minimo di 8×10^5 ad un massimo di 75×10^5 con 5 periteci in cui la conta non è stata possibile in quanto non si sono visualizzate spore. Per quanto riguarda la situazione dell'area 2 (tabella 11) in questa si sono ottenuti valori che vanno da 12.5×10^5 ad un valore di 6×10^6 con 7 campioni privi di ascospore osservate. Per quanto riguarda l'area 3 (tabella 12) si sono ottenuti valori in un intervallo di 25×10^4 a 75×10^5 con 7 periteci che non hanno rilasciato ascospore. Il tasso di germinazione delle ascospore dei periteci varia da 0 a 0.97 %, da 0 a 0.3 %, da 0 a 0.25% per le aree 1, 2 e 3 rispettivamente.

L'analisi del fenotipo riportata in tabella 13 ha confermato la presenza solo di colonie con un fenotipo normale.

Tabella 10 – Prove in vitro ed in vivo per le ascospore dell'Area 1

<i>Area 1</i>							
<i>Campione</i>	<i>Peritecio</i>	<i>Conc.spore /perietcio</i>	<i>Spore germinate /peritecio</i>	<i>Tasso di germinabilità (%)</i>	<i>N.spore messe in coltura (20%)</i>	<i>CFU Ottenute</i>	<i>CFU Ottenute(%)</i>
1PB	1PB2N	75*10 ⁵	5600	0,075	22	12	54,54
	1PB1N	0	0	0	0	0	0
4PB	4PB1N	0	0	0	0	0	0
	4PB1B	25*10 ⁵	0	0	0	0	0
5PB	5PB1BG	0	0	0	0	0	0
	5PB1G	0	0	0	0	0	0
8PB	8PB1BG	0	0	0	0	0	0
	8PB1N	35*10 ⁵	2250	0,064	9	8	88,88
10PA	10PA1BG	8*10 ⁵	7750	0,97	31	30	96,77
	10PA2BG	25*10 ⁵	10400	0,42	42	34	80,95
	10PA3BG	30*10 ⁵	2950	0,098	12	9	75
11PA	11PA1BG	25*10 ⁵	200	0,008	4	3	75
12PA	12PA1BG	27,5*10 ⁵	3050	0,11	12	10	83,33
14PA	14PA1N	20*10 ⁵	7950	0,4	32	24	75
	14PA2N	75*10 ⁵	1400	0,019	6	6	100

Tabella 11 –Valori delle prove in vitro ed in vivo per le ascospore dell'Area 2

Area 2

<i>Campione</i>	<i>Peritecio</i>	<i>Conc.spore /peritecio</i>	<i>Spore germinate / peritecio</i>	<i>Tasso di germinabilità (%)</i>	<i>N.spore messe in coltura (20%)</i>	<i>CFU ottenute</i>	<i>CFU Ottenute (%)</i>
1PD	1PB3B	0	0	0	0	0	0
3PD	3PD1B	25*10 ⁵	200 (40)	0,08	8	7	87,5
	3PD6BG	6*10 ⁶	30 (6)	0,005	6	0	0
	3PD5B	0	0	0	0	0	0
	3PD2B	0	0	0	0	0	0
	3PD1N	27,5*10 ⁵	0	0	0	0	0
	3PD4BG	0	0	0	0	0	0
	3PD1BG	0	0	0	0	0	0
	3PD2BG	10*10 ⁵	300 (60)	0,3	12	0	0
10PD	10PD1BG	0	0	0	0	0	0
	10PD2BG	15*10 ⁵	180 (36)	0,12	7	0	0
	10PD4BG	35*10 ⁵	1035 (207)	0,296	40	12	30
	10PD3BG	15*10 ⁵	200 (40)	0,13	8	0	0
	10PD2BG	125*10 ⁴	25 (5)	0,02	5	0	0
	10PD1BG	0	0	0	0	0	0

Tabella 12 – Valori delle prove in vitro ed in vivo per le ascospore dell'Area 3

<i>Area 3</i>							
<i>Campione</i>	<i>Peritecio</i>	<i>Conc.spore /perietcio</i>	<i>Spore germinate / peritecio</i>	<i>Tasso di germinabilità (%)</i>	<i>N.spore messe in coltura (20%)</i>	<i>CFU ottenute</i>	<i>CFU Ottenute (%)</i>
1PF	1PF1BG	0	0	0	0	0	0
3PF	3PF1B	0	0	0	0	0	0
	3PF2B	75*10 ⁴	0	0	0	0	0
	3PF3B	10*10 ⁵	0	0	0	0	0
	3PF1BG	75*10 ⁵	1040 (208)	0,139	42	22	52,38
4PF	4PF1B	15*10 ⁵	0	0	0	0	0
	4PF1BG	0	0	0	0	0	0
	4PF3B	0	0	0	0	0	0
	4PF2B	25*10 ⁴	30(6)	0,12	6	0	0
5PF	5PF1B	50*10 ⁵	0	0	0	0	0
	5PF1BG	15*10 ⁵	375 (75)	0,25	15	3	20
6PF	6PF1G	475*10 ⁴	220 (44)	0,046	9	4	44,44
7PF	7PF1BG	0	0	0	0	0	0
13PF	13PF1BG	0	0	0	0	0	0
	13PF1G	0	0	0	0	0	0

Tabella 13- Analisi del fenotipo della progenie

<i>Area 1</i>			<i>Area 2</i>			<i>Area 3</i>		
<i>Campioni</i>	<i>Progenie</i>	<i>Fenotipo</i>	<i>Campioni</i>	<i>Progenie</i>	<i>Fenotipo</i>	<i>Campioni</i>	<i>Progenie</i>	<i>Fenotipo</i>
<i>1PB</i>	1PB2N-12	normale	<i>1PD</i>			<i>1PF</i>		
<i>2PB</i>			<i>2PD</i>			<i>2PF</i>		
<i>3PB</i>			<i>3PD</i>	3PD1B-7	normale	<i>3PF</i>	3FP1BG-22	normale
<i>4PB</i>			<i>4PD</i>			<i>4PF</i>		
<i>5PB</i>			<i>5PD</i>			<i>5PF</i>	5FP1BG-3	normale
<i>6PB</i>			<i>6PD</i>			<i>6PF</i>	6FP1G-4	normale
<i>7PB</i>			<i>7PD</i>			<i>7PF</i>		
<i>8PB</i>	8PB1N - 8	normale	<i>8PD</i>			<i>8PF</i>		
<i>9PA</i>		normale						
	10PA3BG -9 10PA2BG-34	normale	<i>10PD</i>	10PD4BG-12	normale	<i>10PF</i>		
<i>11PA</i>			<i>11PD</i>			<i>11PF</i>		
<i>12PA</i>			<i>12PD</i>			<i>12PF</i>		
<i>13PA</i>			<i>13PD</i>			<i>13PF</i>		
<i>14PA</i>			<i>14PD</i>			<i>14PF</i>		
<i>15PA</i>			<i>15PD</i>			<i>15PF</i>		

4.5- Test di compatibilità

Il confronto tra isolati delle singole progenie dai periteci analizzati e degli stessi con i tester europei EU1, EU2, EU3, EU5 e EU12 già individuati come dominanti nelle aree di studio (Pasquini, 2002) è illustrato nelle figure 8,9 e 10 per le aree 1, 2 e 3 rispettivamente. Ad una prima analisi la distribuzione dei 5 gruppi di compatibilità vegetativa nelle progenie delle 3 aree è analoga alla distribuzione nelle popolazioni di isolati da cancri nelle stesse aree riportata da Pasquini (2002) e rappresentano l'81.4% delle progenie (82% degli isolati da cancro riportati da Pasquini B., 2002) (tabella 14). Tutte le progenie analizzate hanno segregato per i gruppi di compatibilità suggerendo un habitus eterotallico. Dalla tabella 14 si evince la presenza di ulteriori gruppi di compatibilità vegetativa raggruppati in "altri" per una percentuale sul totale delle progenie del 18,6. Dall'analisi delle frequenze alleliche per i diversi periteci riferita ai gruppi di compatibilità vegetativa conosciuti è stato calcolato un numero di loci polimorfici compreso tra 2 e 5 (tabella 15). Il peritecio 3PD1B e il peritecio 5FP1BG non presentano alcun polimorfismo. Infine il locus *vic* 3 risulta essere il più conservato (tabella 15).

Figura 8 – Distribuzione dei gruppi di compatibilità nella progenie dell'area 1

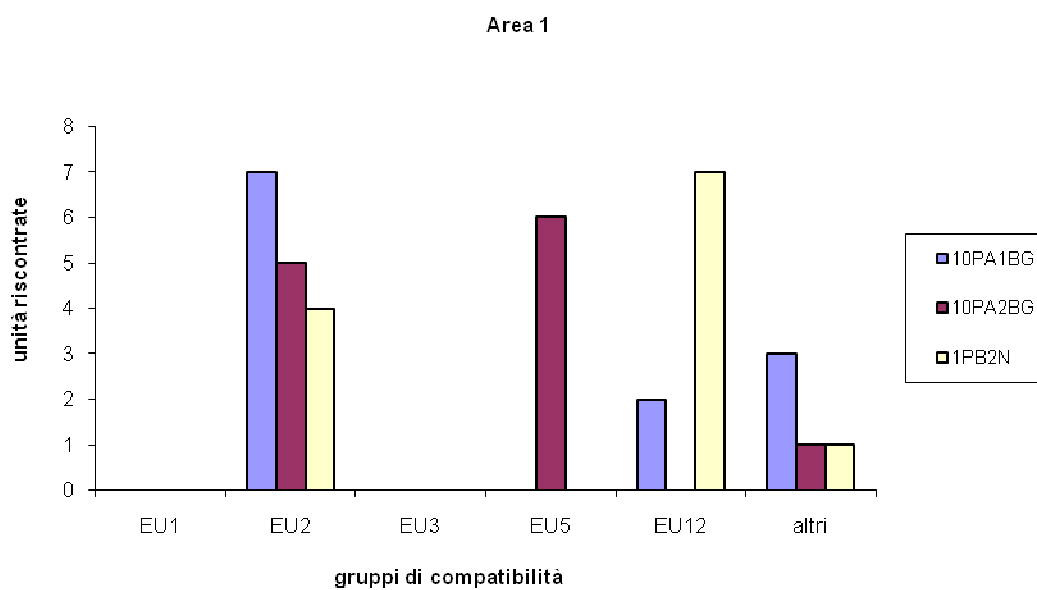


Figura 9 – Distribuzione dei gruppi di compatibilità nella progenie dell'area 2

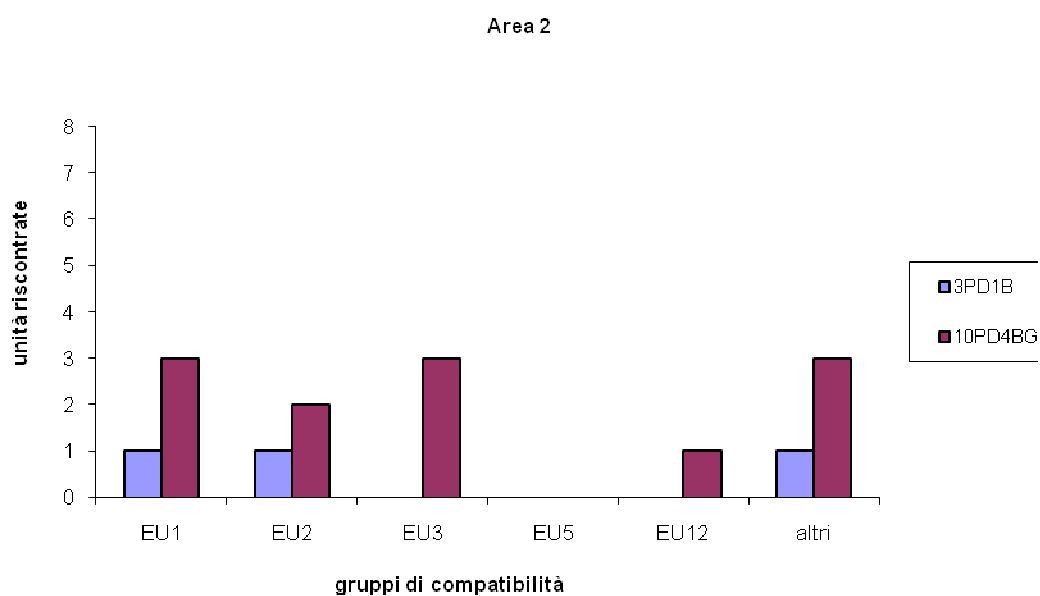
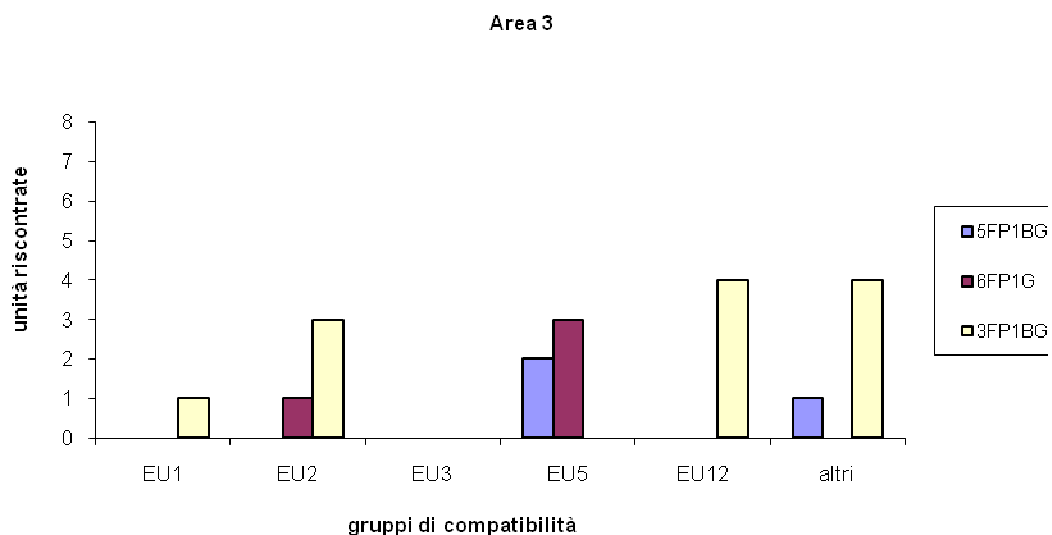


Figura 10 – Distribuzione dei gruppi di compatibilità nella progenie dell'area 3



	Area 1	Area 2	Area3	Media vic della progenie	% dei vic nel Comprensorio (Pasquini, 2002)
EU1	0	4	1	5 (7,14%)	8%
EU2	16	3	4	23 (32,85%)	41%
EU3	0	3	0	3 (4,28%)	6%
EU5	6	0	6	12 (17,14%)	4%
EU12	9	1	4	14 (20%)	23%
Altri	5	4	4	13 (18,57%)	18%
N	36	15	19	70 (81,43%)	82,00%

Tabella 14 – Quadro riassuntivo sulla composizione in gruppi di compatibilità della progenie nelle tre aree di studio

N= numero di isolati analizzati

Tabella 15 – Frequenze alleliche, indice di diversità allelica per i 6 loci vic, valore medio e numero di loci polimorfici per i periteci di *Cryphonectria parasitica*

[illegible]

4.6- Analisi dei tipi sessuali (Mat)

Nella tabella 16 sono riportati i dati avuti dall'analisi dei singoli isolati di cui soltanto 1 peritecio 6FP1BG ha un valore che si discosta dal valore teorico di segregazione 1:1 (tabella 16). Di particolare interesse è l'individuazione di genotipi MAT-1/2 in 6 periteci su 8 analizzati. Nella figura 11 si ha la distribuzione delle frequenze dei MAT-1 e MAT-2 per le tre aree, nella figura 12 sono riportate le frequenze dei MAT-1 e MAT-2 nei diversi vc-groups. Nelle figure 13, 14 e 15 sono riportati i dati assoluti relativi al MAT-1 e MAT-2 della progenie di ogni singolo peritecio. Nella figura 16 è riportato il risultato di un prodotto di amplificazione di 8 dei 70 isolati con relativo standard utilizzato per il confronto.

Tabella 16- Analisi del Mating-type nei periteci

Peritecio	MAT 1	MAT 2	χ^2	Probabilità
10PA1BG	5(2)	5	0,33	0,5
10PA2BG	4(2)	6	0,17	0,5
1PB2N	3(2)	7	0,33	0,5
10PD4BG	6(2)	4	2,16	0,5
3PD1B	2	1	0,33	0,5
5FP1BG	3	0	3,00	0,5
6FP1BG	3(1)	0	4,0	0,5
3FP1BG	6(2)	4	1,33	0,5

() sono riportati i numeri di isolati che presentavano entrambi i Mat
a Test del Chi –quadrato per un rapporto 1:1 e associato al valore della probabilità

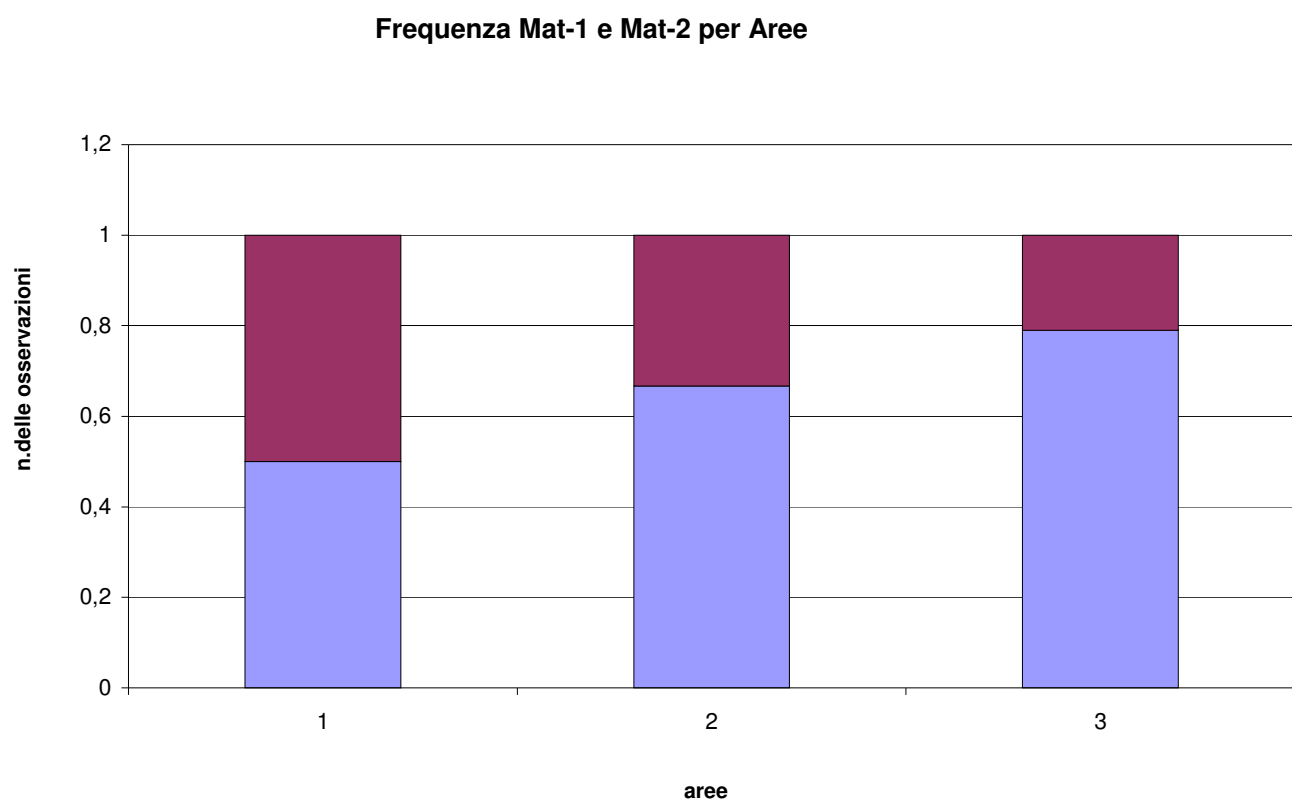


Figura 11- Distribuzione delle frequenze dei Mat-1 e Mat-2 per le tre aree

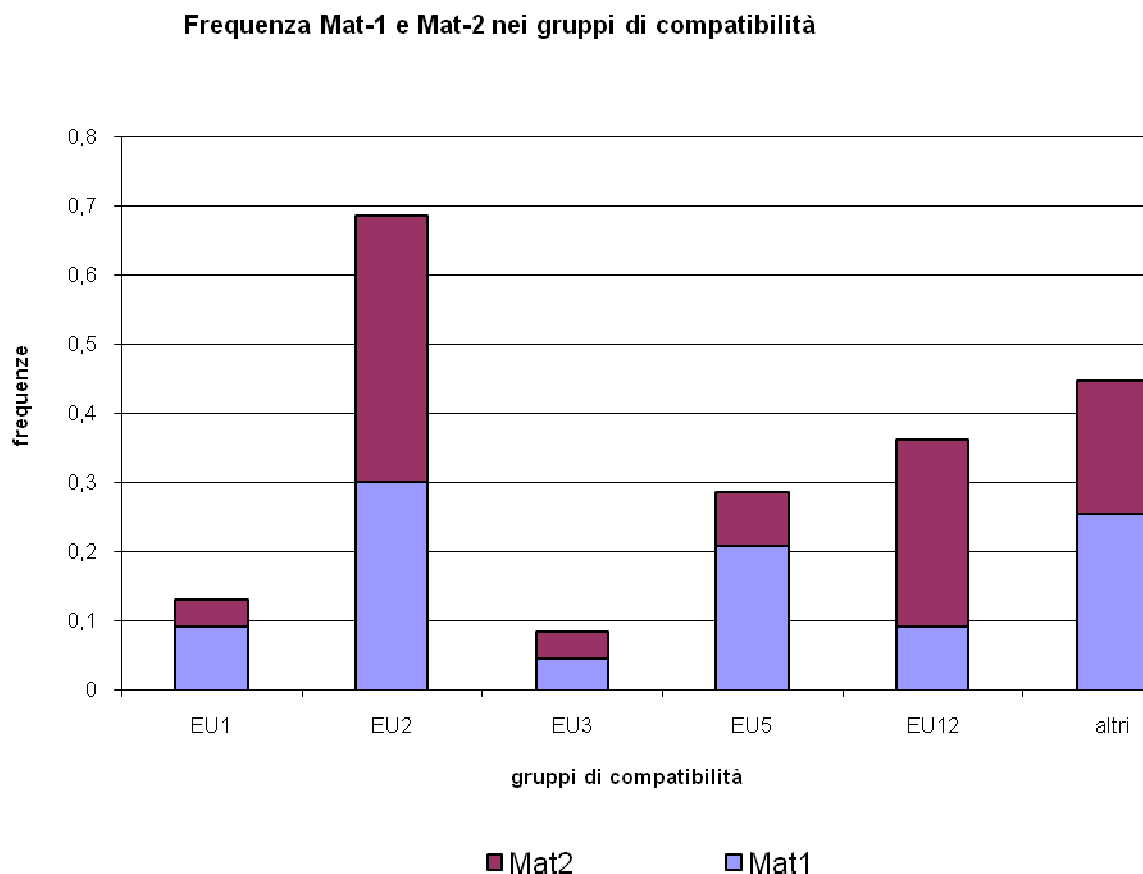


Figura 12 - Distribuzione delle frequenze dei Mat-1 e Mat-2 per i gruppi di compatibilità

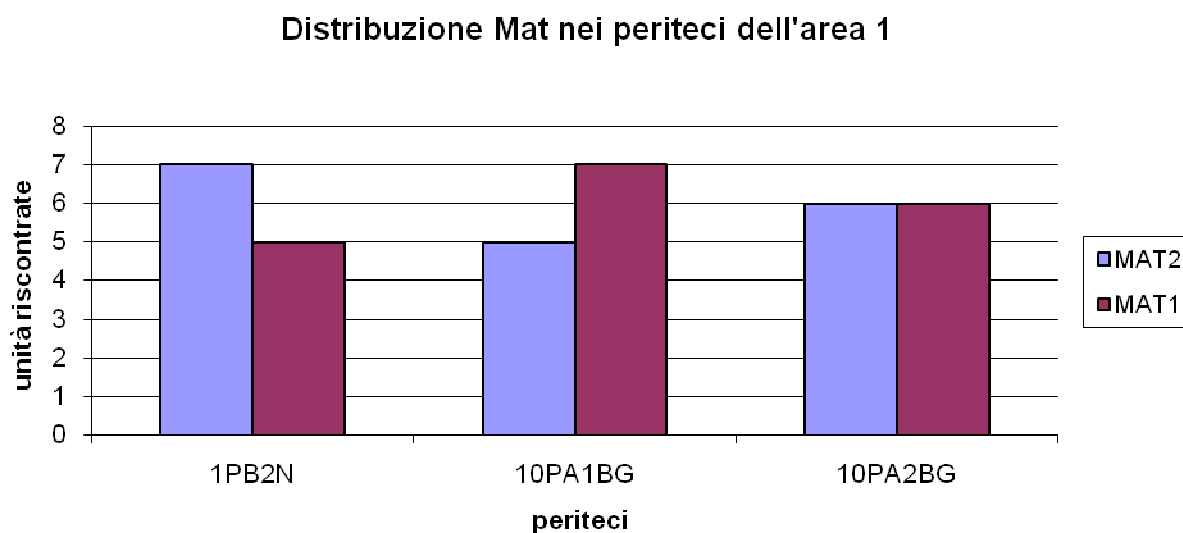


Figura 13 – Distribuzione dei Mat-1 e Mat-2 nella progenie dei periteci dell'area 1

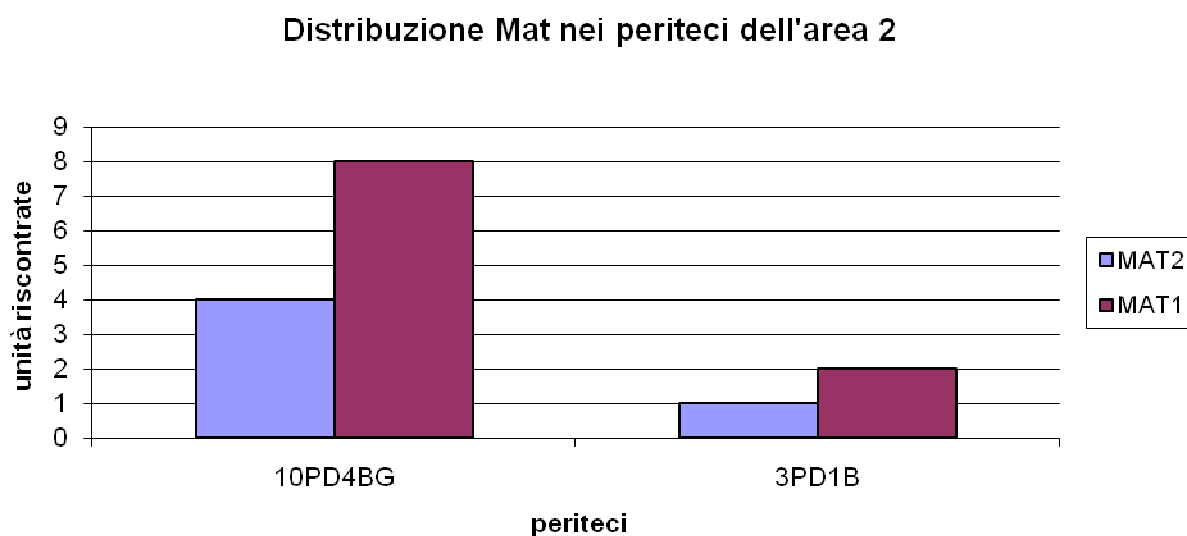


Figura 14 – Distribuzione dei Mat-1 e Mat-2 nella progenie dei periteci dell'area 2

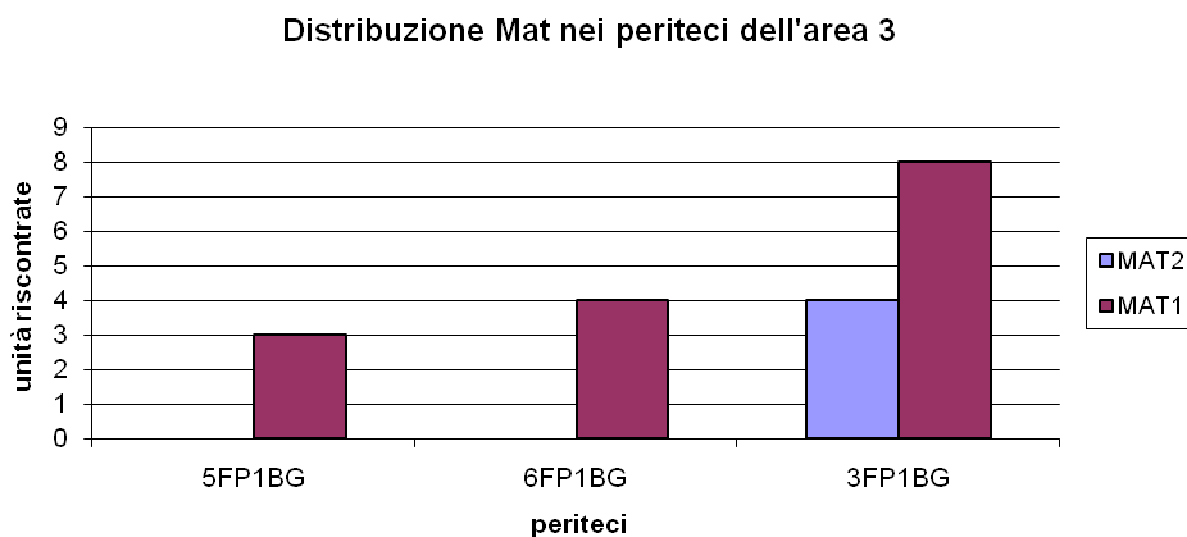


Figura 15 – Distribuzione dei Mat-1 e Mat-2 nella progenie dei periteci dell'area

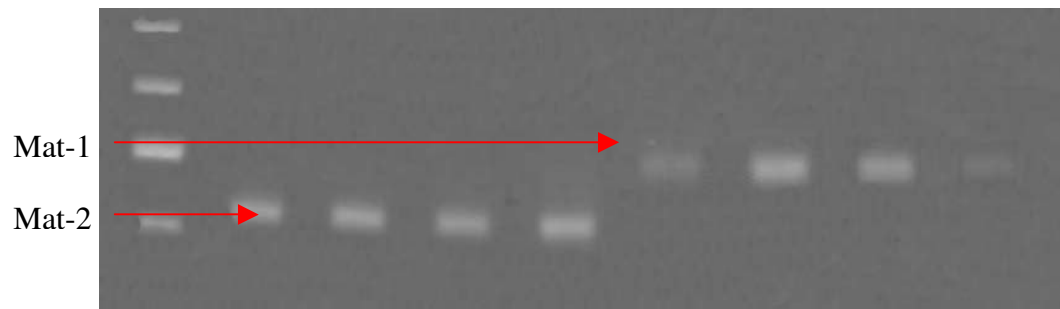


Figura 16 – Prodotti di amplificazione per i Mat-1 e Mat-2 della progenie analizzata
2,0 Kb Mat-1 1,7 Kb Mat-2

5. Discussioni

La frequenza dei ceppi ipovirulenti nel Comprensorio castanicolo dei Monti Cimini negli ultimi 20 anni non è mai variata, seppure si siano indicati 5 loci polimorfici nelle popolazioni presenti sul territorio.

A questo proposito si inserisce questo lavoro di ricerca, in quanto dalle ricognizioni effettuate in campo si è evidenziata la presenza di stroma con periteci, i quali si sono ritrovati per la maggior parte su cancro letali. Lo stroma campionato ha evidenziato la presenza di colli dei periteci, tale stroma posto in camera di crescita ha evidenziato alla temperatura ottimale di 24°C (L.Guerin, G. Froidefond and X.-M. Xu, 2001), sia la capacità di maturare dei periteci sia, nei due controlli T9 e T16, la capacità di espulsione delle ascospore da parte degli stessi, seppure con una bassa percentuale. La concentrazione delle ascospore nei periteci è risultata bassa (average~ $10 \cdot 10^4$ - $27,5 \cdot 10^5$) (L.Guerin, G. Froidefond and X.-M. Xu, 2001) ed in alcuni pari a zero; tale fatto fa presupporre che la probabilità che un'ascospora liberata in campo possa arrivare su di una ferita aperta e provocare una nuova infezione con un nuovo cancro sia bassissima, soprattutto se si considera che il tasso di germinabilità delle stesse non arriva a valori superiori all'1%, evidenziando una scarsa fitness. L'osservazione della maturità della parete dei singoli periteci e la capacità di germinazione delle ascospore, non ha dato una correlazione significativa

in quanto le spore hanno germinato indipendentemente dal grado di maturazione della parete del peritecio dal quale sono state isolate.

Le indagini condotte sulla progenie hanno evidenziato segregazione per ogni singola progenie, circostanza confermata anche dalle successive prove di compatibilità fatte con i tester europei. Ciò permette di considerare *C.parasitica* come fungo eterotallico in questo ambiente. Tali tester sono stati scelti sulla base di un precedente lavoro fatto in questo territorio (Pasquini B., 2002). Per quanto riguarda la composizione in gruppi di compatibilità, è importante osservare che le percentuali riscontrate nel 2002 e nel 2008 degli stessi tester, sono complessivamente immutate; quello che è variato è la distribuzione delle percentuali dei singoli tester con diminuzione di alcuni a vantaggio di altri: ad esempio l'EU2 nel 2002 aveva una distribuzione pari al 41%, mentre nel 2008 è pari al 32,85%; l'EU5 nel 2002 aveva una distribuzione pari al 4%, mentre nel 2008 è pari al 17,14%.

La dominanza o comunque una consistente presenza del gruppo EU2 è tipica delle popolazioni di *C.parasitica* dell'Italia Centro-settentrionale, mentre la presenza del gruppo EU12 è tipica delle popolazioni dell'Italia meridionale (Cortesi *et al.*, 1996). Tale dato è particolarmente interessante, considerando i valori della diversità allelica per l'intero comprensorio dei Monti Cimini, dalla quale scopriamo che è abbastanza alta a tutti i loci investigati con l'eccezione del *vic* 2, dove l'allele 1 è presente nel gruppo

EU2 ed EU12; mentre invece il *vic* 3, risulta essere il più conservato. Risultano 5 loci polimorfici nella progenie di un peritecio e per gli altri varia da 2 a 3 a 4 e a nessuno.

La compresenza dei 2 tipi sessuali *MAT-1* e *MAT-2* fa presupporre che non ci siano delle barriere genetiche alla riproduzione sessuata. Entrambi i tipi sessuali sono stati ritrovati nella progenie dei periteci studiati tranne che in due, 5FP1BG e 6FP1G. Il rapporto tra i tipi sessuali di 1:1 è mantenuto in tutti senza deviare dal valore atteso, tranne che per il peritecio 6FP1G, che però forse dato l'esiguo numero di campioni non ha permesso di avere un dato attendibile. La distribuzione dei tipi sessuali nella progenie dei periteci analizzati sembra essere piuttosto omogenea cosa che non si mantiene nei diversi gruppi di compatibilità dove si osserva una maggiore presenza di *MAT-1* nel vc-groups EU2 e una maggiore presenza di *MAT-2* in EU5 e EU12, seppure nel complesso delle tre aree la distribuzione rimane in equilibrio. L'analisi dei tipi sessuati ha evidenziato inoltre per la gran parte della progenie dei periteci investigati la presenza dei due tipi sessuali e pertanto una forma di heterokaryon (McGuire *et al.*, 2004). Tutto ciò, considerando i dati precedentemente esposti, chiarisce molti aspetti del comportamento di *C.parasitica* in questo territorio e il limitato diffondersi della forma virulenta.

6. Conclusioni

Il cancro corticale nel comprensorio dei Monti Cimini è ad oggi in una fase di forte regressione, grazie ad una massiccia diffusione dell'ipovirulenza esclusiva.

In questi ultimi 7 anni non si sono differenziati nuovi gruppi di compatibilità; la forma sessuale del fungo è presente e potenzialmente si potrebbero avere nuovi incroci con l'insorgenza di nuovi gruppi di compatibilità.

I dati scaturiti da questo lavoro di ricerca, condotto direttamente sui periteci e le ascospore, hanno evidenziato una scarsa aggressività delle stesse, cosa che ci fa ben sperare nei confronti di un eventuale riscoppio della malattia.

In considerazione di ciò, assume una grande importanza l'adozione da parte di tutti gli operatori della filiera castagno, con particolare riguardo per le ditte boschive e i vivaisti, di una profilassi sanitaria attenta ad eventuali introduzioni nel territorio investigato di nuovi gruppi di compatibilità o nuovi ceppi virulenti più aggressivi di quelli già presenti.

Tale considerazione è avvalorata da indagini condotte tra le ditte boschive che operano in questi boschi, che spesso provengono da altre regioni d'Italia e che potenzialmente potrebbero introdurre nuovi ceppi del fungo.

Un altro settore da controllare è quello delle segherie che, con l'importazione di legname per grosse travature non ancora lavorato, si pone certamente come potenziale vettore di nuovi ceppi provenienti da zone dell'Europa centrale, dove la malattia ha un diverso decorso epidemico.

7.Bibliografia

ANAGNOSTAKIS S., and KRANZ J., 1987. Population dynamics of *Cryphonectria parasitica* in a mixed-hardwood forest in Connecticut. *Phytopatology* 77:751-754.

ANAGNOSTAKIS S., DAY P.R., 1979. Hypovirulence conversion in *Endothia parasitica*. *Phytopathology* 69: 1226-1229.

ANAGNOSTAKIS S., Hau B. & Kranz J., 1986. Diversity of - vegetative compatibility groups of *Cryphonectria parasitica* in Connecticut. *Phytopatology* 77:751-754.

ANAGNOSTAKIS S.,1988. *Cryphonectria parasitica*: Cause of chestnut blight. *Adv. Plant Pathology*, 6: 123-136.

ANAGNOSTAKIS S.,1997. Vegetative incompatibilità in *Endothia parasitica*. *Exp.Mycol.* 1: 306-316.

BERRY F.H., 1960. Relative resistance of some chestnut species and hybridis inoculated with the blight fungus. *North. Nut Grow. Assoc. Annu. Rep.* 51 : 46-47, Also see *Plant Dis. Rep.* 44: 716-717. IV

CHOI GH., NUSS DL., 1992. Hypovirulence of chestnut blight fungus conferred by an infectious viral cDNA. *Science* 257 : 800-803.

CORTESI P., MILGROOM M.G. and BISIACH M.,1996. Distribution and diversity of vegetative compatibility types in subpopulations of *Cryphonectria parasitica* in Italy. Mycology Reserch 100 (9) : 1087-1093.

DAY PR., DODDS JA., ELLISTON JE., JAYNES RA., ANAGNOSTAKIS SL., 1977. Double-stranded RNA in *Endothia parasitica*. Phytopatology 84 : 528-534.

DODGE B.O.,1927. Nuclear phenomena associated with heterothallism and homothallism in the ascomycete *Neurospora*. J.Agric.Res.35: 289-305.

FAHIMA T., KAZMIERCZAK P., HANSEN D.R., PFEIFFER P., VAN ALFEN N.K., 1993. Membrane-associated replication of an unencapsidated double-stranded RNA of the fungus *Cryphonectria parasitica*. Virology 195: 81-89.

GRANATA G., SIDOTI A., GULLOTTO A., e PENNESI A.M., 1992. Incidenza del cancro della corteccia del castagno in Sicilia e prove di compatibilità vegetativa. Estratto da – Tecnica Agricola- n.1:1-10.

GRENTÉ J., SAURET S., 1969. L'hypovirulence exclusive, phenomene original en pathologie vegetale. C.R. Hebd. Seances Acad. Sci., 268:2347-2350.

GRIFFIN G.J., 1986.Chestnut blight and ist control. Hortic. Rev. 8:291-336.

GUERIN L., G.FROIDEFOND and X.-M.Xu, 2001. Seasonal patterns of dispersal of ascospores of *Cryphonectria parasitica*. Plant Pathology 50:717-724.

GUERIN L., S. BASTIEN and B. CHAUVIN, 1999. The production and dispersal of ascospores of *Cryphonectria parasitica* in a orchard in south-western France. Acta Hort. 494, ISHS.

HEBARD F.V., 1982. Biology of virulent and hypovirulent *Endothia parasitica* on American chestnut (*Castanea dentate*). Ph. D. diss. Virginia Polytechnic Institute, Blacksburg.

HILLMAN B.I., RAE B., TARTAGLIA J. and NUSS D.L., 1989. Elucidating the structures and function of double stranded RNA genetic elements associated with the biological control of chestnut blight. Pages 59-70 in Molecular Biology of Plant-Pathogen Interactions. B. Staskawicz, P. Ahlquist and O. Yoder, eds. Proc. UCLA Symp. Vol. 101 Alan R. Liss, Inc, New York.

HILLMAN BI., FULBRIGHT DW., NUSS DL., VAN ALFEN NK., 1995. Hypoviridae. In: *Sixth Report of the International Committee on the Taxonomy of Viruses* (eds Murphy FA, Fauquet CM, Bishop DHL et al.), pp.261-264. Springer-Verlag, New York.

HOEGGER P., ALLEMAN C., HEINIGER U., and RIGLING D., 1999. Genetic variation of *Cryphonectria* hypoviruses (CHV1) in Europe,

assessed using restriction fragment length polymorphism (RFLP) markers. Molecular ecology 8 : 843-854.

HUBER D.H., 1996. Genetics analysis of vegetative compatibility polymorphisms and horizontal transmission in the chestnut blight fungus *Cryphonectria parasitica*. Ph.D. Thesis, Michigan State University, East Lansing, MI.

MARRA R.E., P.CORTESI, M BISSEGGER and MG MILGROOM, 2004. Mixed mating in natural populations of the chestnut blight fungus, *Cryphonectria parasitica*. Heredity Vol.93, 189-195.

MARRA R.E.& MICHAEL G. MILGROOM, 2001. The mating system of the fungus *Cryphonectria parasitica*: selfing and self-incompatibility. Heredity Vol.86, 134-143.

McDONALD WL., FULLBRIGHT D.W., 1991. Biological control of chestnut blight : use and limitation of transmissible hypovirulence. Plant disease, Vol.75:656-660.

McGUIRE I.C., MARRA R.E., G.B. TURGEON and M. MILGROOM, 2001. Fungal Genetics and Biology Vol. 34, 131-144.

MCGUIRE I.C., MARRA R.E., MILGROOM M.G., 2003. Mating-type heterokaryosis and selfing in *Cryphonectria parasitica*. Fungal Genetics and Biology 41: 521-533.

METZENBERG R.L., GLASS N.L., 1990. Mating type and mating strategies in *Neurospora* . BioEssay 12:53-59.

MILGROOM M.G., CORTESI P., 1999. Analysis of population structure of the chestnut blight fungus based on vegetative incompatibility genotypes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96 : 10518-10523.

OLD K.M. and KOBAYASHI T., 1988. Eucalyptus are susceptible to the chestnut blight fungus, *Cryphonectria parasitica*. Aust. J. Bot., 36 : 599-603.

PASQUINI B., 2001. Incidenza del cancro corticale del castagno nel comprensorio dei Monti Cimini e gruppi di compatibilità vegetativa nelle popolazioni di *Cryphonectria parasitica*.

PEEVER T.L., LIU Y.-C., WANG K. HILLMAN B.I., FOGLIA R., and MILGROOM M.G., 1998. Incidence and diversity of double stranded RNA s infecting the chestnut blight fungus, *Cryphonectria parasitica*, in China and Japan. Phytopathology 88: 811-817.

RAE B.P., HILLMAN B.I., TARTAGLIA J and NUSS D.L., 1989. Characterization of double-stranded RNA genetic elements associated with biological control of chestnut blight: organization of terminal dominans and identification of gene products. Embo Journal Vol.8 –3 : 657-663

RAJU N.B., PERKINS D.D., 2000. Programmed ascospore death in the homothallic ascomycete *Coniochaeta tetraspora*. Fungal Genetics Biology 30: 213-221.

ROANE M.K., GRIFFIN G.J., HELKINS J.R., 1986. Chestnut blight, other endothia disease and the genus *Endothia*. APS Monograph Series. St.Paul, Minnesota, U.S.A.: APS Press 53pp.

ROBIN C., HEINIGER U., 2001. Chestnut blight in Europe: diversity of *Cryphonectria parasitica*, hypovirulence and biocontrol. For. Snow Landsc.Res. 76,3:361-367.

TURCHETTI T., MARESI G., 1990. Indagini sulla diffusione naturale degli isolati di *Cryphonectria parasitica* in alcuni cedui di castagno. Atti Giornate Fitopatologiche, 2 : 89-98.

VANNINI A., 1985. Situazione attuale del cancro della corteccia del castagno nella provincia di Viterbo; con particolare riferimento alla diffusione dei ceppi ipovirulenti e alla loro caratterizzazione.

YIR-CHUNG LIU, PAOLO CORTESI, MARK L. DOUBLE, WILLIAM L. MACDONALD, and MICHAEL MILGROOM, 1996. Diversity and multilocus genetic structure in populations of *Cryphonectria parasitica*. Genetics Vol.86, N.12, 1344-1351.

ZAMBONELLI A., ZECCHINI D'AURELIO A., 1986. Compatibilità vegetativa e sessuale di ceppi di *Endothia parasitica* (Murr.). Informatore fitopatologico, 10: 39-42.

RINGRANZIAMENTI

Si ringrazia vivamente il dott. Paolo Cortesi dell'Istituto di patologia Vegetale dell'Università di Milano per aver fornito i tester europei indispensabili per l'analisi della compatibilità vegetativa.

Ringrazio vivamente il Dr. Giorgio Vuono per la sua amicizia e il Dr. Marco Santurbano, che con le loro grandi capacità di ricercatori mi hanno aiutata nell'ultima fase di questo lavoro di ricerca.

Ringrazio il Prof. Naldo Anselmi ed il Prof. Leonardo Varvaro per la loro pazienza e il loro sostegno durante questo lungo cammino.

Porterò sempre con me il ricordo e le esperienze lavorative fatte durante questi anni, il sorriso delle mie colleghe, la D.ssa Tomassini Alessia, la D.ssa Barbara Ceccarelli e la D.ssa Natalia Bruni che con le loro capacità e conoscenze mi hanno supportato eccellentemente nel mio lavoro di ricerca in laboratorio. Ringrazio la D.ssa Diana Martignoni, la D.ssa Maria Pia Aleandri, il Dr. Roberto Reda e il Dr. Stefano Speranza per la loro amicizia e per la loro grande disponibilità dimostratami. Ringrazio vivamente il Prof. Gabriele Chilosi per l'ospitalità offertami nel suo studio e per la sua disponibilità.

Ringrazio e ricorderò con tanto affetto la D.ssa Eleonora Rocco e la D.ssa Serena Ruisi per l'amicizia dimostratami. Infine ringrazio la mia famiglia e

soprattutto le mie figlie che mi hanno dato ogni giorno il sorriso e la forza di affrontare e raggiungere un così importante traguardo.